

Rec'd PCT/PTO 11 FEB 2005

#2

PCT/JPG3/10209

10/524193

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

11.08.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2002年 8月12日

REC'D 26 SEP 2003

出願番号
Application Number: 特願2002-235008
[ST. 10/C]: [JP 2002-235008]

WIPO PCT

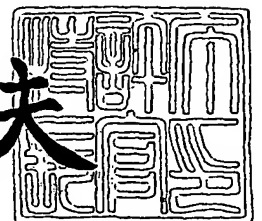
出願人
Applicant(s): 独立行政法人産業技術総合研究所

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 9月12日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 331H01018

【提出日】 平成14年 8月12日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/09

【発明の名称】 低温での組み換えタンパク質の発現に適した新規発現ベクター

【請求項の数】 42

【発明者】

 【住所又は居所】 北海道札幌市豊平区月寒東2条17丁目2番1号 独立
行政法人 産業技術総合研究所 北海道センター内

 【氏名】 中島 信孝

【発明者】

 【住所又は居所】 北海道札幌市豊平区月寒東2条17丁目2番1号 独立
行政法人 産業技術総合研究所 北海道センター内

 【氏名】 田村 具博

【特許出願人】

 【識別番号】 301021533

 【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所

【代理人】

 【識別番号】 100091096

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

 【識別番号】 100118773

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 藤田 節

【選任した代理人】

【識別番号】 100111741

【弁理士】

【氏名又は名称】 田中 夏夫

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 低温での組み換えタンパク質の発現に適した新規発現ベクター

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 宿主細胞中で外来遺伝子を誘導物質により誘導発現し得る発現ベクターであって、該宿主以外の宿主の好適生育温度範囲以下の温度で発現し得る発現ベクター。

【請求項 2】 宿主細胞中で外来遺伝子を誘導物質により誘導発現し得る発現ベクターであって、15℃以下の温度で発現し得る発現ベクター。

【請求項 3】 4℃で発現し得る請求項 1 または 2 記載の発現ベクター。

【請求項 4】 宿主細胞がRhodococcus属細菌である、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の発現ベクター。

【請求項 5】 Rhodococcus属細菌がR. erythropolis、R. fasciansおよびR. opacusからなる群から選択される、請求項 4 記載の発現ベクター。

【請求項 6】 誘導物質がチオストレプトンである、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の発現ベクター。

【請求項 7】 外来遺伝子が、15℃を超える中高温条件下で宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質をコードする、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の発現ベクター。

【請求項 8】 誘導物質により発現を調節し得るプロモーター配列、外来遺伝子を導入可能なマルチクロニング部位を含む請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の発現ベクター。

【請求項 9】 請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の発現ベクターを含む形質転換体。

【請求項 10】 請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の発現ベクターを用いてタンパク質を産生する方法。

【請求項 11】 宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に該宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質をコードする遺伝子を、該宿主細胞の好適生育温度範囲より低い好適生育温度範囲を有する他の宿主細胞中で誘導物質により誘導発現し得る誘導型発現ベクター。

【請求項 1 2】 4℃で発現し得る請求項 1 1 記載の発現ベクター。

【請求項 1 3】 宿主細胞がRhodococcus属細菌である、請求項 1 1 または 1 2 に記載の発現ベクター。

【請求項 1 4】 Rhodococcus属細菌がR. erythropolis、R. fasciansおよびR. opacusからなる群から選択される、請求項 1 3 記載の発現ベクター。

【請求項 1 5】 誘導物質がチオストレプトンである、請求項 1 1 から 1 4 のいずれか 1 項に記載の発現ベクター。

【請求項 1 6】 誘導物質により発現を調節し得るプロモーター配列、外来遺伝子を導入可能なマルチクローニング部位を含む請求項 1 1 ～ 1 5 のいずれか 1 項に記載の発現ベクター。

【請求項 1 7】 請求項 1 1 ～ 1 6 のいずれか 1 項に記載の発現ベクターを含む形質転換体。

【請求項 1 8】 請求項 1 1 ～ 1 6 のいずれか 1 項に記載の発現ベクターを用いてタンパク質を産生する方法。

【請求項 1 9】 Rhodococcus属細菌中で外来遺伝子を誘導物質により誘導発現し得る発現ベクター。

【請求項 2 0】 Rhodococcus属細菌がR. erythropolis、R. fasciansおよびR. opacusからなる群から選択される、請求項 1 9 記載の発現ベクター。

【請求項 2 1】 誘導物質がチオストレプトンである、請求項 1 9 または 2 0 記載の発現ベクター。

【請求項 2 2】 TipA遺伝子プロモーター配列、外来遺伝子を導入可能な第 1 のマルチクローニング部位および転写終結配列を含む発現カセット、第 2 のプロモーター配列およびTipA遺伝子を含む誘導カセット、Rhodococcus属細菌用プラスミドの自律複製に必須な DNA 領域ならびにチオストレプトン耐性遺伝子を含む、請求項 1 9 ～ 2 1 のいずれか 1 項に記載の発現ベクター。

【請求項 2 3】 請求項 1 9 ～ 2 2 のいずれか 1 項に記載の発現ベクターを含むRhodococcus属細菌形質転換体。

【請求項 2 4】 請求項 1 9 ～ 2 2 のいずれか 1 項に記載の発現ベクターを用いてタンパク質を産生する方法。

【請求項 25】 15℃を超える中高温条件下では発現産物が宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質をコードする遺伝子を、低温条件下で増殖可能なRhodococcus属細菌で誘導発現し得るRhodococcus属細菌用誘導型発現ベクター。

【請求項 26】 TipA遺伝子プロモーター配列、外来遺伝子を導入可能な第1のマルチクローニング部位および転写終結配列を含む発現カセット、第2のプロモーター配列およびTipA遺伝子を含む誘導カセット、Rhodococcus属細菌用プラスミドの自律複製に必須なDNA領域ならびにチオストレプトン耐性遺伝子を含む、外来遺伝子を低温条件下で増殖可能なRhodococcus属細菌内で誘導発現し得るRhodococcus属細菌用誘導型発現ベクター。

【請求項 27】 さらに大腸菌用プラスミドの自律複製に必須なDNA領域を含み、大腸菌中で複製可能な請求項 26 記載のRhodococcus属細菌用誘導型発現ベクター。

【請求項 28】 TipA遺伝子プロモーターがTipA-LG10プロモーターである請求項 26 または 27 に記載のRhodococcus属細菌用誘導型発現ベクター。

【請求項 29】 配列番号 106 に表される塩基配列を有するpTip-NH1、配列番号 107 に表される塩基配列を有するpTip-NH2、配列番号 108 に表される塩基配列を有するpTip-CH1、配列番号 109 に表される塩基配列を有するpTip-CH2、配列番号 110 に表される塩基配列を有するpTip-LNH1、配列番号 111 に表される塩基配列を有するpTip-LNH2、配列番号 112 に表される塩基配列を有するpTip-LCH1、配列番号 113 に表される塩基配列を有するpTip-LCH2、pTip-CH1.1、pTip-CH2.1、pTip-LCH1.1およびpTip-LCH2.1からなる群から選択される請求項 26 から 28 のいずれか 1 項に記載のRhodococcus属細菌用誘導型発現ベクター。

【請求項 30】 Rhodococcus属細菌がR. erythropolis、R. fasciansおよびR. opacusからなる群から選択される、請求項 25 ～ 29 のいずれか 1 項に記載のRhodococcus属細菌用誘導型発現ベクター。

【請求項 31】 請求項 25 から 30 のいずれか 1 項に記載のRhodococcus属細菌用誘導型発現ベクターを含むRhodococcus属細菌形質転換体。

【請求項 32】 外来遺伝子として15℃を超える中高温で発現させることが

困難なタンパク質をコードする遺伝子を含む請求項 2 5 ～ 3 0 のいずれか 1 項に記載の Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクターを低温で増殖可能な Rhodococcus 属細菌に導入し、低温条件下でチオストレプトンを含む培地を用いて前記 Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクター導入細菌を培養することを含む、15℃を超える中高温条件下では発現産物が宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質を低温で産生させる方法。

【請求項 3 3】 15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質が、15℃を超える中高温条件下では宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質である、請求項 3 2 記載のタンパク質を低温で産生させる方法。

【請求項 3 4】 15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質が、大腸菌で15℃を超える中高温で発現させた場合に不活性な封入体を作るタンパク質である、請求項 3 2 記載のタンパク質を低温で産生させる方法。

【請求項 3 5】 好冷菌または低温環境下に生存する動物もしくは植物由来のタンパク質をコードする遺伝子を含む請求項 2 5 ～ 3 0 のいずれか 1 項に記載の Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクターを低温で増殖可能な Rhodococcus 属細菌に導入し、低温条件下でチオストレプトンを含む培地を用いて前記 Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクター導入細菌を培養することを含む、好冷菌または低温環境下に生存する動物もしくは植物由来のタンパク質を低温で産生させる方法。

【請求項 3 6】 外来遺伝子を含む請求項 2 5 ～ 3 0 のいずれか 1 項に記載の Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクターを低温で増殖可能な Rhodococcus 属細菌に導入し、15℃を超える中高温条件下および低温条件下でチオストレプトンを含む培地を用いて前記 Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクター導入細菌を培養し、15℃以下の低温条件下でのみ発現される遺伝子を選択することを含む、15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質をスクリーニングする方法。

【請求項 3 7】 15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質が、15℃を超える中高温条件下では宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質である、請求項 3 6 記載の15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質を

スクリーニングする方法。

【請求項 38】 大腸菌に導入し15℃を超える中高温で発現させよとした場合に、発現しないかまたは大腸菌の増殖を阻害する遺伝子を選択し、次いで該遺伝子を外来遺伝子として含む請求項 25～30のいずれか1項に記載のRhodococcus属細菌用誘導型発現ベクターを低温で増殖可能なRhodococcus属細菌に導入し、低温条件下でチオストレプトンを含む培地を用いて前記Rhodococcus属細菌用誘導型発現ベクター導入細菌を培養したときに発現しうる遺伝子を選択することを含む、15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質をスクリーニングする方法。

【請求項 39】 15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質が、大腸菌の増殖を30℃以上で阻害するタンパク質である、請求項 38 記載のタンパク質をスクリーニングする方法。

【請求項 40】 15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質が、大腸菌で15℃を超える中高温で発現させた場合に封入体を作るタンパク質である、請求項 38 記載のタンパク質をスクリーニングする方法。

【請求項 41】 15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質が、15℃を超える中高温条件下では宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質である、請求項 38 記載の15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質をスクリーニングする方法。

【請求項 42】 請求項 36 から 41 のいずれか1項に記載のスクリーニングする方法により得られた15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、Rhodococcus属細菌中で外来遺伝子を誘導発現し得る発現ベクターに関する。

【0002】

また、本発明は、低温において宿主細胞中で組み換えタンパク質を発現するこ

とができる誘導型発現ベクターおよび該ベクターを用いて低温で組み換えタンパク質を発現させる方法に関する。さらに、本発明は約15℃を超える中高温条件下では発現産物が宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質をコードする遺伝子を、低温条件下で増殖可能なRhodococcus属細菌で誘導発現し得るRhodococcus属細菌用誘導型発現ベクターおよび該ベクターを含む低温条件下で増殖可能なRhodococcus属細菌を用いて約15℃を超える中高温条件下では発現産物が宿主細胞の増殖を阻害する組み換えタンパク質を低温で発現させる方法に関する。

【0003】

【従来の技術】

現在、真核生物由来のタンパク質を組み換え体として大量調製するためには大腸菌を宿主とした発現システムが広く用いられている (Weickert et al., Curr. Opin. Biotechnol. 7 494-499 (1996)、Baneyx, Curr. Opin. Biotechnol. 10 411-421 (1999))。大腸菌は中温菌で、18℃から37℃で生育するが、組み換えタンパク質を発現させるための培養温度も上記温度範囲内でなければならない。しかし、真核生物由来のタンパク質がその活性を示すのもまた同じ温度範囲内であり、そのため、いくつかのタンパク質は組み換え体として大腸菌内で発現させると、大腸菌の生育を阻害してしまい、その結果、有意な量の組み換えタンパク質が得られないことがある。

【0004】

大腸菌以外ではSaccharomyces cerevisiaeやPichia pastoris (Cereghino and Cregg, Curr. Opin. Biotechnol. 10 422-427 (1999))、Sf9細胞 (Miller, Curr. Opin. Genet. Dev. 3 97-101 (1993)) など真核細胞を宿主として用いた発現システムが知られているが、これらも培養温度が30℃前後でないと組み換えタンパク質を効率よく発現させることが出来ず、同様の理由からその調製が困難な場合がある。例えば、組み換えタンパク質の産生に通常用いられている昆虫細胞Sf9を用いて外来タンパク質の産生を行う場合、その産生のための至適温度は約28℃であり、最低温度は約18℃である (Agathos et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 589 372-398 (1990)、Faber et al., Yeast 11 1331-1344 (1995))。また、酵母 (Pichia pastoris) を用いて外来タンパク質の産生を行う場合、その産生のための

至適温度は約30℃であり、最低温度は約15℃である (Brock et al., J. Membr. Biol. 180 147-161 (2001)、Sarramegna et al., Protein Expr. Purif. 24 212-220 (2002))。すなわち、昆虫細胞Sf9の好適生育温度範囲は約18℃以上であり、酵母の好適生育温度範囲は約15℃以上である。またこれらを宿主とした場合、いくつかのタンパク質は糖鎖などの修飾を受けてしまい、その後の立体構造解析などの機能解析に不都合なことがある。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、大腸菌をはじめとする他の組み換えタンパク質発現システムで発現させることが出来ないタンパク質を発現させることを目的とする。例えば、15℃を超える中高温条件下で大腸菌等の形質転換宿主細胞中で発現させることができないタンパク質を低温で発現させることを目的とする。

また、本発明は、Rhodococcus属細菌を用いて外来の組み換えタンパク質を誘導発現させることを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

上記問題を解決するためには、組み換えタンパク質の活性を抑制するために、低温で発現させることが有効だと考えられる。大腸菌においては、低温誘導性プロモーターを用いた15～16℃での発現システムが、最も低い温度で組み換えタンパク質を産生させた例である (特公平10-503090、Mujacic et al., Gene 238 325-332 (1999))。また、上述のように昆虫細胞や酵母でも15℃～18℃での組み換えタンパク質の産生が従来知られていた最も低い温度での組み換えタンパク質の産生である。従って、従来の公知の宿主細胞を用いての組み換えタンパク質を発現させ得る最低温度である15℃～18℃以下、好ましくは4℃前後で発現させることが有効であると考えられた。しかし、15℃以下、特に4℃前後では上述の宿主細胞はいずれも生育が困難であり、タンパク質の産生も不可能であるため、約15℃以下の低温、特に4℃前後でも生育できる細菌を宿主とした発現システムを用いれば良いと考えられる。そこで、本発明者らは、Rhodococcus属細菌を宿主とした、広範な温度域 (4℃から32℃前後) において、外来蛋白質を発現せしめ

る誘導型発現ベクターを構築することによって、かかる問題を解決しようとした。

【0 0 0 7】

Rhodococcus erythropolis (Larkin et al., Antonie van Leeuwenhoek 74 133-153 (1998)) は4℃から35℃までの広範な温度域で生育する放線菌で、同菌と大腸菌との両細胞種で自律複製可能な複合ベクター (De Mot et al., Microbiology 143 3137-3147 (1997)) も開発されており遺伝子工学の研究も容易である。またRhodococcus属細菌全般でも、大腸菌との複合ベクターが開発されており (特開平5-64589、特開平8-56669)、外来遺伝子を構成的に発現せしめる汎用的発現ベクターも存在する (特開平10-248578)。

【0 0 0 8】

しかし、効率よく迅速に低温でタンパク質を発現させるためには、容易に、厳密に、強力にタンパク質の発現調節が出来る誘導型発現ベクターの開発が不可欠である。すなわち、まず発現を抑制した状態で、30℃において細胞を増殖させ、その後温度を例えば4℃に下げて発現を誘導するのである。しかし、これまでに同菌においてそのような誘導型発現ベクターの報告がなく、他種の細菌由来の発現誘導システムを流用することが有効だと考えられた。

【0 0 0 9】

Streptomyces coelicolorはRhodococcus erythropolisと同じく放線菌の一種で、同菌では抗生物質チオストレプトンの添加によって発現が誘導される一連の遺伝子群が知られていた (Murakami et al., J. Bacteriol. 171 1459-1466 (1989))。そのうちの一つTipA遺伝子は253アミノ酸からなるタンパク質をコードしており、このTipAタンパク質はチオストレプトンと共有結合し、自身のプロモーター領域にTipA-チオストレプトン複合体として作用し、自身の構造遺伝子からの転写を強力に促進することが知られていた (Holmes et al., EMBO J. 12 3183-3191 (1993)、Chiu et al., Biochemistry 35 2332-2341 (1996))。また、このTipA遺伝子プロモーターとTipA構造遺伝子を用いた誘導型発現ベクターも開発されており、Streptomyces属内で外来タンパク質を発現させた例がある (Enguita et al., FEMS Microbiol. Lett. 137 135-140 (1996))。Rhodococcus erythropolis

においても、TipA構造遺伝子、並びにTipA遺伝子プロモーターの下流に標的タンパク質の構造遺伝子を連結した遺伝子群を導入したベクターを構築すれば、このStreptomyces属細菌同様に、誘導型発現ベクターになりうると考えられるが、その報告はなかった。

【0010】

また、約15℃以下の低温、特に4℃で組み換えタンパク質を生産可能になれば、宿主の増殖を阻害するタンパク質を生産させるだけでなく、以下に述べるような利点もあると考えられる。

【0011】

大腸菌で組み換えタンパク質を37℃で発現させると、封入体と呼ばれる不活性なタンパク質の凝集を作る場合がある。しかし、同一のタンパク質でも発現時の温度を30℃以下にすると活性のある可溶性のタンパク質が生産される例が多数知られている (Schein and Niteborn, *Bio/Technology* 6 291-294 (1988)、Piatak et al., *J. Biol. Chem.* 263 4837-4843 (1988)、Schirano and Shibata, *FEB S Lett.* 271 128-130 (1990)、Vasnia and Baneyx, *Protein Expr. Purif.* 9 211-218 (1997)、Lin et al., *Protein Expr. Purif.* 1 169-176 (1990))。従って、約15℃以下の低温、特に4℃前後での発現システムが構築されればこの可溶化の問題も解決されることが考えられる。

【0012】

さらに、好適生育温度範囲が20℃以下の細菌である好冷菌、低温環境下に生存する変温動物、低温環境下に生存する植物由来のタンパク質も約15℃以下の低温、特に4℃前後での生産が好ましいと考えられる。これは、これらのタンパク質は温度が高い場合、活性のあるタンパク質として発現されないことがあると考えられるからである。これに関しては、好冷菌由来の α -amylaseを好冷菌を宿主として発現させた例が唯一存在するものの (Tutino et al., *Extremophiles* 5 257-264 (2001))、発現誘導型のベクターではなく、迅速に大量生産させるのは困難だと考えられる。

【0013】

そこで本発明者らは、Rhodococcus属細菌中で外来タンパク質を誘導発現し得

る発現ベクターおよび約15℃以下の低温で外来タンパク質を誘導発現し得る発現ベクターの構築について鋭意検討を行い本発明を完成させるに至った。

【0014】

すなわち、本発明は以下の通りである。

- (1) 宿主細胞中で外来遺伝子を誘導物質により誘導発現し得る発現ベクターであって、該宿主以外の宿主の好適生育温度範囲以下の温度で発現し得る発現ベクター。
- (2) 宿主細胞中で外来遺伝子を誘導物質により誘導発現し得る発現ベクターであって、15℃以下の温度で発現し得る発現ベクター。
- (3) 4℃で発現し得る(1)または(2)の発現ベクター。
- (4) 宿主細胞がRhodococcus属細菌である、(1)から(3)のいずれかの発現ベクター。
- (5) Rhodococcus属細菌がR. erythropolis、R. fasciansおよびR. opacusからなる群から選択される、(4)の発現ベクター。

【0015】

- (6) 誘導物質がチオストレプトンである、(1)から(5)のいずれかの発現ベクター。
- (7) 外来遺伝子が、15℃を超える中高温条件下で宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質をコードする、(1)～(6)のいずれかの発現ベクター。
- (8) 誘導物質により発現を調節し得るプロモーター配列、外来遺伝子を導入可能なマルチクローニング部位を含む(1)～(7)のいずれかの発現ベクター。
- (9) (1)～(8)のいずれかの発現ベクターを含む形質転換体。
- (10) (1)～(8)のいずれかの発現ベクターを用いてタンパク質を産生する方法。

【0016】

- (11) 宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に該宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質をコードする遺伝子を、該宿主細胞の好適生育温度範囲より低い好適生育温度範囲を有する他の宿主細胞中で誘導物質により誘導発

現し得る誘導型発現ベクター。

(12) 4℃で発現し得る(11)の発現ベクター。

(13) 宿主細胞がRhodococcus属細菌である、(11)または(12)の発現ベクター。

(14) Rhodococcus属細菌がR. erythropolis、R. fasciansおよびR. opacusからなる群から選択される、(13)の発現ベクター。

(15) 誘導物質がチオストレプトンである、(11)から(14)のいずれかの発現ベクター。

【0017】

(16) 誘導物質により発現を調節し得るプロモーター配列、外来遺伝子を導入可能なマルチクローニング部位を含む(11)～(15)のいずれかの発現ベクター。

(17) (11)～(16)のいずれかの発現ベクターを含む形質転換体。

(18) (11)～(16)のいずれかの発現ベクターを用いてタンパク質を産生する方法。

(19) Rhodococcus属細菌中で外来遺伝子を誘導物質により誘導発現し得る発現ベクター。

(20) Rhodococcus属細菌がR. erythropolis、R. fasciansおよびR. opacusからなる群から選択される、(19)の発現ベクター。

【0018】

(21) 誘導物質がチオストレプトンである、(19)または(20)の発現ベクター。

(22) TipA遺伝子プロモーター配列、外来遺伝子を導入可能な第1のマルチクローニング部位および転写終結配列を含む発現カセット、第2のプロモーター配列およびTipA遺伝子を含む誘導カセット、Rhodococcus属細菌用プラスミドの自律複製に必須なDNA領域ならびにチオストレプトン耐性遺伝子を含む、(19)～(21)のいずれかの発現ベクター。

(23) (19)～(22)のいずれかの発現ベクターを含むRhodococcus属細菌形質転換体。

(24) (19) ~ (22) のいずれかの発現ベクターを用いてタンパク質を産生する方法。

(25) 15℃を超える中高温条件下では発現産物が宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質をコードする遺伝子を、低温条件下で増殖可能なRhodococcus属細菌で誘導発現し得るRhodococcus属細菌用誘導型発現ベクター。

【0019】

(26) TipA遺伝子プロモーター配列、外来遺伝子を導入可能な第1のマルチクロニング部位および転写終結配列を含む発現カセット、第2のプロモーター配列およびTipA遺伝子を含む誘導カセット、Rhodococcus属細菌用プラスミドの自律複製に必須なDNA領域ならびにチオストレプトン耐性遺伝子を含む、外来遺伝子を低温条件下で増殖可能なRhodococcus属細菌内で誘導発現し得るRhodococcus属細菌用誘導型発現ベクター。

(27) さらに大腸菌用プラスミドの自律複製に必須なDNA領域を含み、大腸菌中で複製可能な(26)のRhodococcus属細菌用誘導型発現ベクター。

(28) TipA遺伝子プロモーターがTipA-LG10プロモーターである(26)または(27)のRhodococcus属細菌用誘導型発現ベクター。

(29) 配列番号106に表される塩基配列を有するpTip-NH1、配列番号107に表される塩基配列を有するpTip-NH2、配列番号108に表される塩基配列を有するpTip-CH1、配列番号109に表される塩基配列を有するpTip-CH2、配列番号110に表される塩基配列を有するpTip-LNH1、配列番号111に表される塩基配列を有するpTip-LNH2、配列番号112に表される塩基配列を有するpTip-LCH1、配列番号113に表される塩基配列を有するpTip-LCH2、pTip-CH1.1、pTip-CH2.1、pTip-LCH1.1およびpTip-LCH2.1からなる群から選択される(26)から

(28) のいずれかのRhodococcus属細菌用誘導型発現ベクター。

(30) Rhodococcus属細菌がR. erythropolis、R. fasciansおよびR. opacusからなる群から選択される、(25) ~ (29) のいずれかのRhodococcus属細菌用誘導型発現ベクター。

【0020】

(31) (25) から(30) のいずれかのRhodococcus属細菌用誘導型発現

ベクターを含むRhodococcus属細菌形質転換体。

(32) 外来遺伝子として15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質をコードする遺伝子を含む(25)～(30)のいずれかのRhodococcus属細菌用誘導型発現ベクターを低温で増殖可能なRhodococcus属細菌に導入し、低温条件下でチオストレプトンを含む培地を用いて前記Rhodococcus属細菌用誘導型発現ベクター導入細菌を培養することを含む、15℃を超える中高温条件下では発現産物が宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質を低温で産生させる方法。

(33) 15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質が、15℃を超える中高温条件下では宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質である、(32)のタンパク質を低温で産生させる方法。

(34) 15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質が、大腸菌で15℃を超える中高温で発現させた場合に不活性な封入体を作るタンパク質である、(32)のタンパク質を低温で産生させる方法。

(35) 好冷菌または低温環境下に生存する動物もしくは植物由来のタンパク質をコードする遺伝子を含む(25)～(30)のいずれかのRhodococcus属細菌用誘導型発現ベクターを低温で増殖可能なRhodococcus属細菌に導入し、低温条件下でチオストレプトンを含む培地を用いて前記Rhodococcus属細菌用誘導型発現ベクター導入細菌を培養することを含む、好冷菌または低温環境下に生存する動物もしくは植物由来のタンパク質を低温で産生させる方法。

【0021】

(36) 外来遺伝子を含む(25)～(30)のいずれかのRhodococcus属細菌用誘導型発現ベクターを低温で増殖可能なRhodococcus属細菌に導入し、15℃を超える中高温条件下および低温条件下でチオストレプトンを含む培地を用いて前記Rhodococcus属細菌用誘導型発現ベクター導入細菌を培養し、15℃以下の低温条件下でのみ発現される遺伝子を選択することを含む、15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質をスクリーニングする方法。

(37) 15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質が、15℃を超える中高温条件下では宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質である、(36)の15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質をスクリーニングす

る方法。

(38) 大腸菌に導入し15℃を超える中高温で発現させよとした場合に、発現しないかまたは大腸菌の増殖を阻害する遺伝子を選択し、次いで該遺伝子を外来遺伝子として含む(25)～(30)のいずれかのRhodococcus属細菌用誘導型発現ベクターを低温で増殖可能なRhodococcus属細菌に導入し、低温条件下でオストレプトンを含む培地を用いて前記Rhodococcus属細菌用誘導型発現ベクター導入細菌を培養したときに発現しうる遺伝子を選択することを含む、15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質をスクリーニングする方法。

(39) 15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質が、大腸菌の増殖を30℃以上で阻害するタンパク質である、(38)のタンパク質をスクリーニングする方法。

(40) 15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質が、大腸菌で15℃を超える中高温で発現させた場合に封入体を作るタンパク質である、(38)のタンパク質をスクリーニングする方法。

【0022】

(41) 15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質が、15℃を超える中高温条件下では宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質である、(38)の15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質をスクリーニングする方法。

(42) (36)から(41)のいずれかのスクリーニングする方法により得られた15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質。

以下、本発明を詳細に説明する。

【0023】

【発明の実施の形態】

1. 本発明の発現ベクターの構築

本発明の発現ベクターは、低温で増殖可能な細胞中で自律複製可能で、該ベクター中に組込まれた外来遺伝子を誘導的に発現し得るベクター、すなわち誘導型発現ベクターである。

【0024】

低温で増殖可能な細胞は限定されず、低温で増殖できる細胞ならば大腸菌、酵母等のいずれの微生物、昆虫細胞、哺乳類細胞等も使用しうる。確実に低温で増殖し得るという点でRhodococcus属に属する細菌、好ましくはR. erythropolis、R. fascians、R. opacus等が挙げられる。これら3種類のRhodococcus属細菌のうち、R. erythropolisが4℃での増殖速度が最も大きく他の2種はそれよりも劣る。しかし、本発明のベクターを用いたタンパク質の産生においては、細胞を増殖に適した温度で増殖させた後に、該細胞を低温に移して誘導的に発現させタンパク質を産生させ得る。従って、4℃で組み換え外来タンパク質を発現産生可能な限り増殖速度は問題とならず、R. erythropolis、R. fascians、R. opacusの3種のRhodococcus属に属する種すべてを好適に用い得る。

【0025】

低温とは、通常の細菌の至適増殖温度よりも低い温度をいい、4℃から18℃、好ましくは4℃から15℃、特に好ましくは4℃前後の温度をいう。通常の細菌の好適生育温度範囲は細菌の種類によっても異なるが約15℃から約40℃または約18℃から約40℃であり、本明細書においては約15℃を超える温度を中高温という。

【0026】

外来遺伝子とは、本発明のベクターを用いて発現産生させようとする標的タンパク質をコードする遺伝子であり、宿主細胞以外の生物由来のタンパク質をコードする遺伝子をいう。本発明のベクターに組込む外来遺伝子は、約15℃を超える中高温で発現させることが困難であるかまたは不可能なタンパク質をコードする遺伝子である。約15℃を超える中高温で発現させることが困難であるかまたは不可能なタンパク質とは約15℃を超える中高温で発現させようとしても、発現効率が低いか全く発現しないタンパク質をいう。このようなタンパク質として宿主細胞の至適生育温度範囲内の温度で発現できないが同一のまたは異なる種類の宿主細胞を用いた場合にその微生物の好適生育温度範囲内の温度よりも低温で発現できるタンパク質、宿主微生物の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に該宿主細胞にとって致死性となるが同一のまたは異なる種類の宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度よりも低温ではそれらの宿主細胞に致死性でないタンパク質、宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に該宿主細胞の増殖を阻

害するが同一のまたは異なる種類の宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度よりも低温ではそれらの宿主細胞の増殖を阻害しないタンパク質、宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に封入体と呼ばれる不活性なタンパク質の凝集を作るが同一のまたは異なる種類の宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度よりも低温でそれらの宿主細胞で発現させた場合に活性のある可溶性タンパク質となるタンパク質、好適生育温度範囲が20℃以下である好冷菌、低温環境下に生存する変温動物、低温環境下に生存する植物由来のタンパク質等をコードする遺伝子が挙げられる。

【 0 0 2 7 】

ある遺伝子が大腸菌に基づく発現系で約15℃を超える中高温で発現させようとしたとき、または該遺伝子を本発明の発現ベクターに含ませRhodococcus属細菌で約15℃を超える中高温で発現させようとしたときに、発現しないかまたは発現量が外来遺伝子を本発明の発現ベクターに含ませRhodococcus属細菌で低温で発現させたときの発現量より有意に低い場合に、該タンパク質は約15℃を超える中高温で発現させることが困難であるかまたは不可能なタンパク質であるといえる。

【 0 0 2 8 】

例えば、通常組み換えタンパク質の発現産生によく用いられる大腸菌を用いて発現させようとした場合に、大腸菌の好適生育温度範囲である18℃から37℃で発現できないか、大腸菌に致死性的となるか、大腸菌の増殖を阻害するか、大腸菌内で凝集し不活性な封入体を作るタンパク質をコードする遺伝子を、Rhodococcus erythropolisに導入してRhodococcus erythropolisを4℃から18℃の低温で増殖させることにより前記タンパク質を効率的に大量に産生させることができる。また、Rhodococcus erythropolisを用いて約15℃を超える温度で発現させようとした場合に、発現できないか、Rhodococcus erythropolisに致死性的となるか、Rhodococcus erythropolisの増殖を阻害するようなタンパク質を、Rhodococcus erythropolisを用いて4℃から15℃の低温で増殖させても前記タンパク質を効率的に大量に産生させることができる。

【 0 0 2 9 】

約15℃を超える中高温条件下で宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質の種類は限定されないが、例えば後述の実施例に記載のタンパク質を例示することができる。これらのタンパク質をコードする遺伝子は、後述のプロモーターの下流にマルチクローニング部位を含ませておきその部位にコードする遺伝子を組込めばよい。

【0030】

外来遺伝子を誘導的に発現し得るベクターとは、一定の処理を施すことにより組込まれた外来遺伝子の発現が誘導されるベクターをいう。例えば、特定の調節物質で発現を誘導し得るプロモーターをベクターに組込むことにより誘導型発現ベクターを構築することが可能である。このようなプロモーターとして宿主細胞の培養培地中に誘導物質である薬剤を導入することにより特異的に誘導するプロモーターがあり、例えばチオストレプトン誘導性プロモーターであるTipA遺伝子プロモーターが挙げられる。このような誘導性プロモーターを組込んだベクターを導入した宿主細胞を15℃から18℃以上の細胞の増殖に適した温度で十分増殖させた後に、タンパク質の発現を誘導する薬剤を添加することにより目的のタンパク質を大量に発現させることができる。さらに、TipAタンパク質をコードするTipA遺伝子、TipA遺伝子の発現を誘導するThcA遺伝子プロモーター等の適当なプロモーターを組込めばよい。宿主細胞がRhodococcus属に属する細菌である場合、該細菌はチオストレプトンに対して感受性であるため、チオストレプトンに対しての耐性を付与するチオストレプトン耐性遺伝子等を組込む。

また、本発明の発現ベクターは、薬剤耐性遺伝子を含んでいてもよい。

【0031】

さらに、複数の宿主細胞に適合させるために複合ベクター（シャトルベクター）であってもよい。例えば、大腸菌およびRhodococcus属に属する細菌のいずれにも導入可能でこれらの宿主細胞中で外来遺伝子を発現しうるベクターが挙げられる。このようなベクターを構築する場合、それぞれの宿主細胞でプラスミドの自律複製に必須なDNA領域を組込んでおく必要がある。例えば、大腸菌とRhodococcus属に属する細菌に適した複合ベクターの場合、大腸菌用プラスミドの自律複製に必須なDNA領域としてColE1配列を、Rhodococcus属に属する細菌用プラスミ

ドの自律複製に必須なDNA領域としてRepAおよびRepB遺伝子を組込めばよい。このような複合ベクターは大腸菌を用いて大量に複製することが可能である。

【0032】

本発明の発現ベクターは、少なくとも第1のプロモーター活性を有するDNA配列、外来遺伝子を組込むための第1のマルチクローニング部位を含む。さらに、第1のプラスミドの自律複製に必須なDNA領域、第1の薬剤耐性遺伝子、第1のマルチクローニング部位に連結された外来遺伝子、第1の転写終結配列を含む。第1のプロモーター活性を有するDNA配列としてTipA遺伝子プロモーターが挙げられ、TipA遺伝子プロモーターを含む場合、TipA遺伝子、およびTipA遺伝子を発現させるためのThcA遺伝子プロモーター等の第2のプロモーター配列、TipA遺伝子下流の第2の転写終結配列を含む。TipA遺伝子プロモーターはTipA-LG10プロモーター等のその配列を改変させたものでもよい。さらに、TipA遺伝子プロモーター誘導発現系を含む場合であって、宿主細胞がRhodococcus属細菌である場合には、Rhodococcus属細菌にチオストレプトンに対する耐性を付与するためにチオストレプトン耐性遺伝子を含んでいる必要がある。

【0033】

プロモーター活性を有するDNA配列、外来遺伝子および転写終結配列は発現カセット (Expression cassette) を構成し、TipA遺伝子およびTipA遺伝子発現用プロモーターは誘導カセット (Inducer cassette) を構成する。

【0034】

本発明のRhodococcus属細菌用発現ベクターは、タンパク質自体が15℃を超える中高温で発現可能なものならば低温ばかりでなく15℃を超える中高温においても該タンパク質を発現させ得る。

【0035】

本発明の発現ベクターとして、図9に記載のpTipベクターが挙げられ、マルチクローニング部位の構造により図9aに示すようにpTip-NH1、pTip-NH2、pTip-CH1、pTip-CH2、pTip-LNH1、pTip-LNH2、pTip-LCH1およびpTip-LCH2、がある。pTip-NH1、pTip-NH2、pTip-CH1、pTip-CH2、pTip-LNH1、pTip-LNH2、pTip-LCH1およびpTip-LCH2ベクターの配列はそれぞれ、配列番号106～113に示される。

さらに、本発明の発現ベクターとして、pTip-CH1、pTip-CH2、pTip-LCH1、pTip-LCH2において、マルチクローニング部位のXhoI部位以降の読み枠を市販のpETベクター（Novagen社）の読み枠と一致させるためにBglIIとXhoI部位を分けたpTip-CH1.1、pTip-CH2.1、pTip-LCH1.1、pTip-LCH2.1がある。

本発明のベクターは、後述の実施例の記載および図1から図8のベクター構築図に従えば容易に構築することができる。

【0036】

2. 本発明のベクターの使用

本発明の発現ベクターを用いて、約15℃を超える中高温で発現させることが困難であるかまたは不可能なタンパク質を産生させることができる。このようなタンパク質として、宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現できないが同一のまたは異なる種類の宿主細胞を用いた場合にその細胞の好適生育温度範囲内の温度よりも低温で発現できるタンパク質、宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に該宿主細胞にとって致死性となるが同一のまたは異なる種類の宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度よりも低温ではそれらの宿主細胞に致死性でないタンパク質、宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に該宿主細胞の増殖を阻害するが同一のまたは異なる種類の宿主細胞の至適温度よりも低温ではそれらの宿主細胞の増殖を阻害しないタンパク質、宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に封入体と呼ばれる不活性なタンパク質の凝集を作るが同一のまたは異なる種類の宿主細胞の至適温度よりも低温でそれらの宿主細胞で発現させた場合に活性のある可溶性タンパク質となるタンパク質、好適生育温度範囲が20℃以下である好冷菌、低温環境下に生存する変温動物、低温環境下に生存する植物由来のタンパク質が挙げられる。

【0037】

これらのタンパク質をコードする遺伝子を本発明の発現ベクターのマルチクローニング部位に適当な制限酵素を用いて組込み、該ベクターで宿主細胞を形質転換し、宿主細胞を低温条件下で培養することにより前記タンパク質を発現させることができる。宿主細胞は、低温で増殖し得る細胞である必要があり、*Rhodococcus*属に属する細菌、好ましくは*R. erythropolis*、*R. fascians*、*R. opacus*等が

挙げられる。これらの細胞は低温で増殖可能であるが、増殖に好適な温度は15℃以上、さらに好適な温度は18℃以上、特に好適な温度は約30℃前後であり、遺伝子を組込んだタンパク質を発現させる前に、増殖に適した温度で十分増殖させたのちに、低温条件下に移しベクター中に含まれる誘導型プロモーターの機能を利用して適当な薬剤を用いてタンパク質を発現させることができる。

【0038】

本発明のベクターが、TipA遺伝子プロモーターを含む場合、チオストレプトンを培地に添加することによりタンパク質の発現が誘導される。この際チオストレプトンは、終濃度0.1 μ g/ml以上、好ましくは1 μ g/ml以上となるように添加すればよい。ただし、10 μ g/mlを越えると生育が悪くなる。

【0039】

本発明のベクターを用いて、約15℃を超える中高温で発現させることが困難であるかまたは不可能なタンパク質をスクリーニングすることができる。このようなタンパク質として、宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現できないが同一のまたは異なる種類の宿主細胞を用いた場合にその細胞の好適生育温度範囲内の温度よりも低温で発現できるタンパク質、宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に該宿主細胞にとって致死性となるが同一のまたは異なる種類の宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度よりも低温ではそれらの宿主細胞に致死性でないタンパク質、宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に該宿主細胞の増殖を阻害するが同一のまたは異なる種類の宿主細胞の至適温度よりも低温ではそれらの宿主細胞の増殖を阻害しないタンパク質、宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に封入体と呼ばれる不活性なタンパク質の凝集を作るが同一のまたは異なる種類の宿主細胞の至適温度よりも低温でそれらの宿主細胞で発現させた場合に活性のある可溶性タンパク質となるタンパク質が挙げられる。

【0040】

例えば、適当な動物種の適当な組織からpoly(A)+RNAを抽出し、cDNAを合成し、発現ベクターに組込む。次いで、該ベクターを用いて大腸菌等の宿主細胞を形質転換し、発現ライブラリーを構築し、30℃で増殖発現させた場合に、増殖が阻

害されるクローンから組込まれた遺伝子を単離することにより、宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に該宿主細胞にとって致死性となるが同一のまたは異なる種類の宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度よりも低温ではそれらの宿主細胞に致死性でないタンパク質または宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に該宿主細胞の増殖を阻害するが同一のまたは異なる種類の宿主細胞の至適温度よりも低温ではそれらの宿主細胞の増殖を阻害しないタンパク質をコードする遺伝子を選択する。この際、発現ベクターに適当な薬剤で誘導されるプロモーターを組込んでおき薬剤で発現を誘導した場合に宿主細胞の増殖が阻害され、誘導しない場合には宿主細胞が増殖するようなクローンを選択すればよい。次いで、単離した遺伝子を本発明の発現ベクターに組込んで、該組み換え発現ベクターでRhodococcus erythropolisを形質転換し、4℃から15℃の低温で増殖発現させ、増殖が阻害されることなく前記遺伝子を発現するクローンを選択することにより、上記タンパク質をコードする遺伝子をスクリーニングすることができる。また、cDNAライブラリーの遺伝子を本発明の発現ベクターに組込んで、該組み換え発現ベクターでRhodococcus erythropolisを形質転換し、低温または約15℃を超える中高温で培養し、増殖が阻害されることなく組込んだ遺伝子を発現するクローンを選択するか、または発現誘導させたときに発現される遺伝子を組込んだクローンを選択することにより上記タンパク質をコードする遺伝子をスクリーニングすることができる。

【0041】

前記スクリーニングにより得られた約15℃を超える中高温で発現させることが困難であるかまたは不可能なタンパク質も本発明に包含される。このようなタンパク質として、後述の実施例に記載されたタンパク質が例示できる。

【0042】

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

〔実施例1〕

Rhodococcus erythropolis由来の、Rhodococcus属細菌内で自律複製可能なプラ

スミドの分離とその一部DNA配列の決定

Rhodococcus erythropolisと大腸菌の複合ベクターを作成するために、まずRhodococcus属細菌内に存在する小型の内在性プラスミドを検索した。すると、Rhodococcus erythropolis JCM2895 株にその存在が確認された。このプラスミドにpRE2895と名前を付けた。以下にプラスミドの分離と、そのDNA配列決定について具体的に述べる。

【0043】

Rhodococcus erythropolis JCM2895株を5mlのLB培地（1% Difco Bacto Tryptone、0.5% Difco Yeast Extract、1.0% 塩化ナトリウム）にて、30℃で30時間培養した菌体からQIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN社製）を用いてpRE2895を精製した。この際、Buffer P1 250 μ lに懸濁後、Buffer P2 250 μ lを加える前に、5 μ lのリゾチーム（100mg/ml）を加え37℃で30分インキュベートした点を除いては、使用説明書通りに作業した。

【0044】

上記DNAサンプルを制限酵素EcoRIで処理し、1.0%アガロースゲル電気泳動（100V、30分）に供したところ、約5.4kbのDNA断片1本の存在が確認された。

この約5.4kbのDNA断片をゲルから切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて、使用説明書通りに精製した。得られたEcoRI断片を常法（Sambrook et al., Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd edition (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.）に従って、プラスミドpBluescript II SK (+)（STRATAGENE社製）のEcoRI部位にサブクローンし、このプラスミドにpHN79と名前を付けた。

【0045】

pHN79をReverse、M13-20 両プライマー（共にSTRATAGENE社製）を用い、DNAシーケンサーABI PRISM(R) 3100 Genetic Analyzer（ABI社製）を用いて、使用説明書に準じて、pHN79の塩基配列を約400塩基ずつそれぞれ決定した。相同性検索の結果、pHN79にサブクローンされたRhodococcus erythropolis JCM2895株由来のDNA領域はその99.8%の配列がGenBankに受入番号AF312210として登録されている5403塩基対の環状DNA、pN30と一致した。

【 0 0 4 6 】

分離したpRE2895は全塩基配列を決定しなかったが、pN30との相同性は極めて高く、また制限酵素切断地図もpN30の配列から予想されるものと一致したことから、これらの相同性はプラスミド全体にわたっていると予想された。また、pN30はMycobacterium fortuitum 002株から分離された内在性プラスミドpAL5000 (Rauzer et al., Gene 71 315-321 (1988)、Stolt and Stoker, Microbiology 142 2795-2802 (1996))、Rhodococcus erythropolis NI86/21株から分離されたpFAJ2600 (De Mot et al., Microbiology 143 3137-3147 (1997)) と相同性が高く、類似の機構で自律複製していると考えられた。pAL5000は推定RepA遺伝子、推定RepB遺伝子、推定複製開始点を含む領域のみで各細菌内で自律複製するために十分であるため、本発明者らが分離したpRE2895も同様の領域のみを発現ベクター中に組み込めば、Rhodococcus属細菌内で自律複製するために十分と考えられた。

【 0 0 4 7 】

〔実施例 2〕

ベクタープラスミドpHN136の構築

実施例 1 で分離したpRE2895の一部と大腸菌内で自律複製可能なプラスミドの一部を用いて両菌の複合ベクターを作成するため以下の作業を行った (図 1)。

【 0 0 4 8 】

プラスミドpBluescript II SK (-) (STRATAGENE社製) をテンプレートとして、配列表中の配列番号 1、2 に記載の合成オリゴデオキシリボヌクレオチドプライマー (以下プライマーと略記) を用いて、ポリメラーゼチェーンリアクション法 (以下、PCRと略記: Saiki et al., Science, 239 487-491 (1988)) によるDNAの増幅を行った。なお、用いたPCR用の酵素はPfu turbo (STRATAGENE社製) である。その結果、アンピシリン耐性遺伝子 (図中においてはAmp^rと表記) と大腸菌内で自律複製させるために必要なColE1配列領域を含む2.0kbの増幅されたDNAを得た。このDNA断片を制限酵素SacIとBsrGIで二重消化し、1.0%アガロースゲル電気泳動 (100V、30分) に供し、該DNA断片を切り出し、QIAquick Gel Extraction Kitを用いて、使用説明書に準じて精製した。

【0049】

一方、pN30（実施例1）の配列をもとにRhodococcus属細菌内で自律複製するために必要と思われる領域を増幅するプライマーを設計した。なお、同プライマーの配列は配列表中の配列番号3、4で示される。プラスミドpHN79をテンプレートとして、両プライマーを用いてPCRによる増幅を行ったところ1.9kbの増幅されたDNAを得た。このDNA断片を制限酵素BsrGIとSacIで二重消化し、1.0%アガロースゲル電気泳動（100V、30分）に供し、該DNA断片を切り出し、上述の方法と同様に精製した。

【0050】

上記2つの精製されたDNA断片をDNA Ligation Kit Ver.2（宝酒造社製）を用いて、使用説明書通りにライゲーションし、得られたプラスミドにpHN129と名前を付けた。

【0051】

次にpHN129に存在する制限酵素認識部位BamHI、SalIを除去するため以下の作業をおこなった。まず、pHN129をテンプレートとして、配列表中の配列番号5、6に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。このPCR断片をBglIIとPstIで二重消化して得られた0.5kbのDNA断片をpHN129のBamHI、PstI部位にサブクローンした。結果、BglIIとBamHIで連結された部分においては推定RepA遺伝子のオープンリーディングフレーム（以下ORFと略記）内であるが、コードされるアミノ酸が置換されることなく、BamHI認識部位が除去された。またSalI認識部位はBamHI認識部位のごく近傍に存在したが、配列番号5に記載のプライマー中において、SalI認識部位が除かれ、かつ、コードされるアミノ酸が置換されないよう設計されていることから、BamHI認識部位と同時にSalI認識部位も除去されている。このプラスミドにpHN135と名前を付けた。

【0052】

次にpHN135に存在する制限酵素認識部位BglIIを除去するため以下の作業をおこなった。まず、プラスミドpHN135をテンプレートとして、配列表中の配列番号5、6に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。このPCR断片をPstIとBamHIで二重消化して得られた0.5kbのDNA断片をpHN135のPstI、BglII部位に

サブクローンした。結果、BamHIとBglIIで連結された部分においては推定RepB遺伝子のORF部分であるが、コードされるアミノ酸が置換されることなく、BglII認識部位が除去された。この結果得られたプラスミドにpHN136と名前をつけた。

【0053】

〔実施例3〕

ベクタープラスミドpHN143の構築

タンパク質の発現誘導には抗生物質チオストレプトンを用いるが、Rhodococcus erythropolisは同物質に対して感受性であるために、耐性を付与させなければならない。そこでStreptomyces azureusが持つチオストレプトン耐性遺伝子、tsr遺伝子 (Bibb et al., Mol. Gen. Genet. 199 26-36 (1985): 図中においては、Thio^rと表記する) を複合ベクター中に組み込むこととした。なお、この遺伝子がRhodococcus erythropolis内で機能し、チオストレプトン耐性を付与することはすでに報告されている (Shao and Behki, Lett. Appl. Microbiol. 21 261-266 (1995))。以下に、同遺伝子の分離について具体的に述べる (図2)。

【0054】

まず、PCRのテンプレートに使用するStreptomyces azureus JCM4217株のゲノムDNAを以下のように調製した。5mlのSB培地 (1% Difco Bacto Tryptone、0.5% Difco Yeast Extract、0.5% 塩化ナトリウム、0.1% Glucose、5mM塩化マグネシウム、0.5% グリシン) にて30℃で培養した同菌株を500 μ lのSETバッファー (75mM 塩化ナトリウム、25mM EDTA (pH8.0)、20mM Tris-HCl (pH7.5)) に懸濁した。そこに、5 μ lのリゾチーム溶液 (100mg/ml) を加え、37℃で30分インキュベートした。そして、14 μ lのプロテアーゼK溶液 (20mg/ml) と60 μ lの硫酸ドデシルナトリウム溶液 (10%) を加え、よく混合した後55℃で2時間インキュベートした。その後、200 μ lの塩化ナトリウム溶液 (5M) と500 μ lのクロロホルムを加え、20分間室温で回転撹拌した。遠心分離し、700 μ lの上清をとった。これをイソプロパノール沈殿後、乾燥させ、50 μ lのTE溶液 (10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA (pH8.0)) に溶解した。

【0055】

上記のように精製したStreptomyces azureus JCM4217株のゲノムDNAをテンプ

レートとして、配列表中の配列番号 7、8 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、チオストレプトン耐性遺伝子を含む 1.1kb の増幅された DNA を得た。なおこの DNA 断片はプラチナ Pfx DNA ポリメラーゼ (Gibco BRL 社製) を用いたため、その末端は平滑末端である。この DNA 断片を精製し、常法 (Sambrook et al., Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd edition (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) に従い 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した後、プラスミド pGEM-3Zf(+) (Promega 社製) の HincII 部位にサブクローンした (サブクローンされた向きは DNA の 5' 方向から HindIII 認識部位-tsr 遺伝子 ORF-EcoRI 認識部位である)。このプラスミドに pHN137 と名前を付けた。

【0056】

次に pHN137 に存在する制限酵素認識部位 SalI を除去するため以下の作業をおこなった。まず、プラスミド pHN137 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 9、10 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。なおこの PCR にはプラチナ Pfx DNA ポリメラーゼを用いた。この PCR 断片の片方の末端を HindIII で消化して得られた 0.6kb の DNA 断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。一方、プラスミド pHN137 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 11、12 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。なおこの PCR にはプラチナ Pfx DNA ポリメラーゼを用いた。この PCR 断片の片方の末端を EcoRI で消化して得られた 0.5kb の DNA 断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。これら 2 つの PCR 断片を同時にプラスミド pGEM-3Zf(+) の HindIII、EcoRI 部位にサブクローンした結果、平滑末端同士で連結された部分においては tsr 遺伝子の ORF 部分であるが、コードされるアミノ酸が置換されることなく、SalI 認識部位が除去された。このプラスミドに pHN143 と名前を付けた。

【0057】

〔実施例 4〕

ベクタープラスミド pHN62 の構築

チオストレプトンによって誘導型発現をさせるためには Rhodococcus 属細菌内

にTipAタンパク質を存在させなければならない。そのために、Rhodococcus erythropolisから構成的なプロモーターを分離し、その下流にTipAタンパク質をコードする構造遺伝子を連結した(図3)。構成的に機能するプロモーターとしてはRhodococcus erythropolisのアルデヒドデヒドロゲナーゼ様タンパク質をコードするThcA遺伝子(Nagy et al., J. Bacteriol. 177 676-687 (1995))のプロモーター配列を用いた。

【0058】

テンプレートに使用するStreptomyces coelicolor A3(2)株のゲノムDNAはStreptomyces azureusからゲノムDNAを調製したときと同様に作業し、精製した。また、Rhodococcus erythropolis JCM3201株のゲノムDNAは5mlのLB培地で培養した点を除いてはStreptomyces azureusからゲノムDNAを調製したときと同様に作業し、精製した。

【0059】

上述のように精製したStreptomyces coelicolor A3(2)株のゲノムDNAをテンプレートとして、配列表中の配列番号13、14に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。なおこのPCRにはプラチナPfx DNAポリメラーゼを用いた。その結果、TipA遺伝子のORF並びにその下流の転写終結配列を含むDNA(図中においてはTipAと表記)を得た。

【0060】

このPCR断片の片方の末端をBglIIで消化して得られた0.9kbのDNA断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の5'末端をT4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。一方、上述のように精製したRhodococcus erythropolis JCM3201株のゲノムDNAをテンプレートとして、配列表中の配列番号15、16に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、アルデヒドデヒドロゲナーゼ様タンパク質をコードするThcA遺伝子(Nagy et al., J. Bacteriol. 177 676-687 (1995))のプロモーター配列(図中においてはALDHpと表記)を含むDNAを得た。なおこのPCRにはプラチナPfx DNAポリメラーゼを用いた。このPCR断片の片方の末端をXbaIで消化して得られた0.2kbのDNA断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の5'末端をT4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。

これら2つのPCR断片を同時にプラスミドpGEM-3Zf(+)のXbaI、BamHI部位にサブクローンした結果、ThcA遺伝子のプロモーター配列のすぐ下流にTipA遺伝子のORF並びに転写終結配列を含むプラスミドが作成され、pHN33と名前を付けた。

【0061】

次にpHN33に存在する制限酵素NcoI認識部位2カ所（以下、NcoI(1)、NcoI(2)と表記する）を除去するため以下の作業をおこなった。

まず、プラスミドpHN33をテンプレートとして、配列表中の配列番号9、17に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。なおこのPCRにはプラチナPfx DNAポリメラーゼを用いた。このPCR断片の片方の末端をXbaIで消化して得られた0.5kbのDNA断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の5'末端をT4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。一方、プラスミドpHN33をテンプレートとして、配列表中の配列番号18、12に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。なおこのPCRにはプラチナPfx DNAポリメラーゼを用いた。このPCR断片の片方の末端をKpnIで消化して得られた0.6kbのDNA断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の5'末端をT4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。これら2つのPCR断片を同時にプラスミドpGEM-3Zf(+)のXbaI、KpnI部位にサブクローンした結果、平滑末端同士で連結された部分においてはTipA遺伝子のORF部分であるが、コードされるアミノ酸が置換されることなく、NcoI(1)認識部位が除去された。このプラスミドにpHN50と名前を付けた。

【0062】

次にpHN33に存在する制限酵素認識部位NcoI(2)を除去するため以下の作業をおこなった。まず、プラスミドpHN33をテンプレートとして、配列表中の配列番号9、19に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。なおこのPCRにはプラチナPfx DNAポリメラーゼを用いた。このPCR断片の片方の末端をXbaIで消化して得られた0.8kbのDNA断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の5'末端をT4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。一方、プラスミドpHN33をテンプレートとして、配列表中の配列番号20、12に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。なおこのPCRにはプラチナPfx DNAポリメラーゼを用いた。このPCR断片の片方の末端をKpnIで消化して得られた0.3kbのDNA断片を

精製し、さらに常法により平滑末端側の5'末端をT4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。これら2つのPCR断片を同時にプラスミドpGEM-3Zf(+)のXbaI、KpnI部位にサブクローンした結果、平滑末端同士で連結された部分においてはTipA遺伝子のORF部分であるが、コードされるアミノ酸が置換されることなく、NcoI(2)認識部位が除去された。このプラスミドにpHN51と名前を付けた。

【0063】

最後に以下の作業を行った。pHN50をXbaIとSacIで二重消化して得られた0.7kbのDNA断片とpHN51をSacIとKpnIで二重消化した0.4kbの断片を同時にプラスミドpGEM-3Zf(+)のXbaI、KpnI部位にサブクローンした。結果、NcoI(1)とNcoI(2)両方の制限酵素部位を欠いたTipA遺伝子を持つプラスミドを取得し、これにpHN62と名前をつけた。

【0064】

〔実施例5〕

ベクタープラスミドpHN153の構築

目的のタンパク質を誘導的に発現せしめることができるかどうか確認するために、TipA遺伝子のプロモーターの下流にレポーター遺伝子としてThermoplasma acidophilum由来のプロリンイミノペプチダーゼ (Tamura et al., FEBS Lett. 398 101-105 (1996): 以下PIPと略記する) をコードする遺伝子のORF (図中においてはPIP ORFと表記) を連結し、さらにその下流に転写のリードスルーを抑制するために転写終結配列を連結した。以下に具体的に述べる (図4)。

【0065】

実施例4にて精製したStreptomyces coelicolor A3(2)株のゲノムDNAをテンプレートとして、配列表中の配列番号21、22に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、TipA遺伝子のプロモーター配列 (図中においてはTipApと表記) を含む0.2kbの増幅されたDNAを得た。なおこのPCRにはプラチナPfx DNAポリメラーゼを用いた。この断片を精製し、常法により5'末端をT4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した後、プラスミドpBluescript II SK (+)のSmaI部位にサブクローンした (サブクローンされた向きはDNAの5'方向からKpnI認識部位-TipA遺伝子プロモーター配列-SacI認識部位である)。このプラス

ミドにpHN150uと名前を付けた。

【0066】

次に、プラスミドpRSET-PIP (Tamura et al., FEBS Lett. 398 101-105 (1996): 以下PIPと略記する) をテンプレートとして、配列表中の配列番号23, 24に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。なお、配列表中の配列番号24のプライマーはPIP遺伝子の終止コドンを除いて、かつタンパク質の精製を容易にするために6×HisタグがPIPタンパク質のC末端に付くように設計されている。6×Hisタグは、6つの連続したヒスチジン残基から成る連続配列で、これを融合したタンパク質は、ニッケルイオン等に高い親和性を示すようになる。従って、ニッケルイオン等を用いた金属キレートクロマトグラフィーで精製が容易になる (Crowe et al., Methods Mol. Biol. 31 371-387 (1994))。このPIP遺伝子を含む0.9kbのDNA断片を制限酵素NcoIとSpeIで二重消化し、pHN150uのNcoI、SpeI部位にサブクローンした結果、TipA遺伝子のプロモーター配列のすぐ下流にPIP遺伝子のORFを含むプラスミドが作成され、pHN151uと名前を付けた。

【0067】

次に、実施例4にて精製したRhodococcus erythropolis JCM3201株のゲノムDNAをテンプレートとして、配列表中の配列番号25, 26に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、ThcA遺伝子の転写終結配列 (Nagy et al., J. Bacteriol. 177 676-687 (1995): 図中においてはALDHtと表記) を含むDNAを得た。この0.2kbのDNA断片を制限酵素SpeIとXbaIで二重消化し、pHN151uのSpeI、XbaI部位にサブクローンした。その結果、TipA遺伝子のプロモーター配列のすぐ下流にPIP遺伝子のORFを含み、またそのすぐ下流にThcA遺伝子の転写終結配列を含むプラスミドが作成され、pHN153と名前を付けた。

【0068】

〔実施例6〕

ベクタープラスミドpHN169の構築

Rhodococcus erythropolisをプラスミドで形質転換するためには適当な形質転換マーカが必要になる。そこでRhodococcus属細菌内で機能する強力なプロモーターの下流に薬剤耐性遺伝子を連結し、使用することとした。プロモーターと

しては、Streptomyces属細菌由来の Elongation factor TuをコードするTuf1遺伝子プロモーターを用いることとしたが、これは同プロモーターが強力に下流の遺伝子を転写せしめるとの報告があるからである (Wezel et al., Biochim. Biophys. Acta 1219 543-547 (1994))。また、薬剤耐性遺伝子は入手が容易なテトラサイクリン耐性遺伝子を用いた。以下に具体的に述べる (図5)。

【0069】

実施例4にて精製したStreptomyces coelicolor A3(2)株のゲノムDNAをテンプレートとして、配列表中の配列番号27、28に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、Tuf1遺伝子のプロモーター配列 (図中においてはTuf1pと表記) を含む0.2kbの増幅されたDNAを得た。なおこのPCRにはプラチナPfx DNAポリメラーゼを用いた。この断片を精製し、常法により5'末端をT4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した後、プラスミドpBluescript II SK (+) のHincII部位にサブクローンした (サブクローンされた向きはDNAの5'方向からKpnI認識部位-Tuf1遺伝子プロモーター配列-EcoRI認識部位である)。このプラスミドにpHN158と名前を付けた。

【0070】

次に、プラスミドpACYC184 (Rose, Nucleic Acids Res. 16 355 (1988)) をテンプレートとして、配列表中の配列番号29、30に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、テトラサイクリン耐性遺伝子 (図中においてはTet^rと表記) を含むDNAを得た。この1.3kbのDNA断片を制限酵素XhoIとSpeIで二重消化し、pHN158のSalI、SpeI部位にサブクローンした結果、Tuf1遺伝子のプロモーター配列のすぐ下流にテトラサイクリン耐性遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN159と名前を付けた。

【0071】

次にpHN159に存在する制限酵素認識部位BamHIを除去するため以下の作業をおこなった。まず、プラスミドpHN159をテンプレートとして、配列表31、32に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。なおこのDNA断片はPfu turbo DNAポリメラーゼを用いたため、その末端は平滑末端である。このPCR断片の片方の末端をXhoIで消化して得られた0.5kbのDNA断片を精製し、さらに常法に

より平滑末端側の5'末端をT4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。一方、プラスミドpHN159をテンプレートとして、配列表中の配列番号33、34に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。なおこのPCRにはPfu turbo DNAポリメラーゼを用いた。このPCR断片の片方の末端をNotIで消化して得られた1.1kbのDNA断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の5'末端をT4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。これら2つのPCR断片を同時にプラスミドpBluescript II SK (+)のXhoI、NotI部位にサブクローンした結果、平滑末端同士で連結された部分においてはテトラサイクリン耐性遺伝子のORF部分であるが、コードされるアミノ酸が置換されることなく、BamHI部位が除去された。このプラスミドにpHN165と名前を付けた。

【0072】

次にpHN159に存在する制限酵素認識部位SalIを除去するため以下の作業をおこなった。まず、プラスミドpHN159をテンプレートとして、配列表中の配列番号31、35に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。なおこのPCRにはPfu turbo DNAポリメラーゼを用いた。このPCR断片の片方の末端をXhoIで消化して得られた0.8kbのDNA断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の5'末端をT4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。一方、プラスミドpHN159をテンプレートとして、配列表中の配列番号36、34に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。なおこのPCRにはPfu turbo DNAポリメラーゼを用いた。このPCR断片の片方の末端をNotIで消化して得られた0.8kbのDNA断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の5'末端をT4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。これら2つのPCR断片を同時にプラスミドpBluescript II SK (+)のXhoI、NotI部位にサブクローンした結果、平滑末端同士で連結された部分においてはテトラサイクリン耐性遺伝子のORF部分であるが、コードされるアミノ酸が置換されることなく、SalI認識部位が除去された。このプラスミドにpHN166と名前を付けた。

【0073】

最後に以下の作業を行った。pHN166をSphIとSpeIで二重消化して得られた0.9kbのDNA断片をpHN165のSphI、SpeI部位にサブクローンした。結果、BamHIとSalI

両方の制限酵素認識部位を欠くテトラサイクリン耐性遺伝子クローンを取得し、このプラスミドにpHN169と名前をつけた。

【0074】

〔実施例7〕

ベクタープラスミドpHN170、pHN171の構築

実施例2から6までに分離してきた遺伝子群を連結し、Rhodococcus属細菌内で誘導可能な発現ベクターを構築するために以下の作業を行った（図6）。

【0075】

pHN143をSacIで消化して得られた1.1kbのDNA断片をpHN136のSacI部位にサブクローンした（サブクローンされた向きはDNAの5'方向から推定RepB遺伝子ORF-tsr遺伝子ORF-アンピシリン耐性遺伝子ORFである）。その結果できたプラスミドにpHN144と名前をつけた。

【0076】

次に、pHN62をXbaIとKpnIで二重消化して得られた1.1kbのDNA断片をpHN144のXbaI、KpnI部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドにpHN152と名前をつけた。

【0077】

次に、pHN153をBsrGIとXbaIで二重消化して得られた1.2kbのDNA断片をpHN152のBsrGI、SpeI部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドにpHN154と名前をつけた。

【0078】

次に、pHN169をXbaIとSpeIで二重消化して得られた1.6kbのDNA断片をpHN154のXbaI部位にサブクローンした（サブクローンされた向きはDNAの5'方向からtsr遺伝子ORF-テトラサイクリン耐性遺伝子ORF-ThcA遺伝子プロモーター配列である）。その結果TipA遺伝子プロモーターの制御下に置かれたPIP遺伝子を含むプラスミドが作成され、できたプラスミドにpHN170と名前をつけた。

【0079】

また組み換えタンパク質の高発現化のため、TipA遺伝子プロモーター下流のリボソーム結合部位を翻訳効率の良いとされるラムダファージgene10由来の配列（

Gold and Stormo, Methods Enzymol. 185 89-93 (1990)) に変化させた (図 6)。
以下に具体的に述べる。

【0080】

プラスミド pHN170 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 21, 37 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、TipA 遺伝子プロモーターとラムダファージ gene10 由来リボソーム結合部位からなるハイブリッドプロモーター (以下 TipA-LG10 プロモーターと表記する: 図中に置いては TipA-LG10p と表記) を得た。この 0.2kb の DNA 断片を制限酵素 BsrGI と NcoI で二重消化し、pHN170 の BsrGI、NcoI 部位にサブクローンした。その結果 TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた PIP 遺伝子を含むプラスミドが作成され、できたプラスミドに pHN171 と名前をつけた。図 22 に TipA プロモーター配列を、図 23 に TipA プロモーターの TipA-LG10 プロモーターへの改変のためのリボソーム結合部位 (RBS) 配列の改良を示す。

【0081】

〔実施例 8〕

ベクタープラスミド pTip-NH1、pTip-CH1、pTip-LNH1、pTip-LCH1 の構築

実施例 7 で述べたプラスミドからレポーターである PIP 遺伝子を除き、マルチクロニング部位を導入するため以下の作業を行った (図 7)。

【0082】

配列表中の配列番号 38、39 に記載の合成オリゴデオキシリボヌクレオチドはマルチクロニング部位になる配列を含み、お互いに相補的な配列を持つ。これら 2 つを等モル量ずつ混合し、70℃ で 10 分処理し、20 分かけて室温に冷却し、2 本鎖化させた。その結果、その末端は NcoI と SpeI で二重消化されたベクターと連結可能な状態になり、この 2 本鎖化した合成 DNA (図中においては MCS Linker NNco と表記) を pHN170 の NcoI、SpeI 部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドに pTip-NH1 と名前をつけた。また、配列表中の配列番号 40、41 に記載の合成オリゴデオキシリボヌクレオチド (マルチクロニング部位になる配列を含み、お互いに相補的な配列を持つ) を同様に 2 本鎖化させた合成 DNA (図中においては MCS Linker CNco と表記) を pHN170 の NcoI、SpeI 部位にサブクローン

した。その結果できたプラスミドにpTip-CH1と名前をつけた。

【0083】

実施例7で述べたTipA遺伝子プロモーター配列とラムダファージgene10由来リボソーム結合部位からなるハイブリッドDNAを制限酵素BsrGIとNcoIで二重消化し、pTip-NH1とpTip-CH1のBsrGI、NcoI部位にそれぞれサブクローンした。結果得られたプラスミドにpTip-LNH1、pTip-LCH1とそれぞれ名前を付けた。

【0084】

〔実施例9〕

ベクタープラスミドpTip-NH2、pTip-CH2、pTip-LNH2、pTip-LCH2の構築

実施例8で述べたプラスミドpTip-NH1、pTip-CH1、pTip-LNH1、pTip-LCH1において、マルチクローニング部位の最も上流のNcoI部位をNdeIに変更するために以下の作業を行った(図8)。

【0085】

プラスミドpHN170をテンプレートとして、配列表中の配列番号21、42に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、TipA遺伝子プロモーターを含むDNAを得た。この0.2kbのDNA断片を制限酵素BsrGIとNdeIで二重消化し、pHN170のBsrGI、NdeI部位にサブクローンした。結果得られたプラスミドにpHN183と名前を付けた。

【0086】

配列表中の配列番号43、44に記載の合成オリゴデオキシリボヌクレオチドはマルチクローニング部位になる配列を含み、お互いに相補的な配列を持つ。これら2つを等モル量ずつ混合し、70℃で10分処理し、20分かけて室温に冷却し、2本鎖化させた。その結果、その末端はNdeIとSpeIで二重消化されたベクターと連結可能な状態になり、この2本鎖化した合成DNA(図中においてはMCS Linker NNdeと表記)をpHN183のNdeI、SpeI部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドにpTip-NH2と名前をつけた。また、配列表中の配列番号45、46に記載の合成オリゴデオキシリボヌクレオチド(マルチクローニング部位になる配列を含み、お互いに相補的な配列を持つ)を同様に2本鎖化させた合成DNA(図中においてはMCS Linker CNdeと表記)をpHN183のNdeI、SpeI部位にサブクローン

した。その結果できたプラスミドにpTip-CH2と名前をつけた。

【0087】

プラスミドpTip-LNH1をテンプレートとして、配列表中の配列番号21、47に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、TipA遺伝子プロモーターとラムダファージgene10由来リボソーム結合部位からなるハイブリッドDNAを得た。この0.2kbのDNA断片を制限酵素BsrGIとNdeIで二重消化し、pTip-NH2とpTip-CH2のBsrGI、NdeI部位にそれぞれサブクローンした。結果得られたプラスミドにpTip-LNH2、pTip-LCH2とそれぞれ名前を付けた。

【0088】

実施例8、9で作成したプラスミドのマップと、マルチクローニング部位周辺の配列をまとめて図9に示す。該図中、実線の矢印はTipA遺伝子プロモーター中に存在するInverted repeat配列を示す。斜線の矢印はThcA遺伝子転写終結配列に存在するInverted repeat配列を示す。また、原核生物のプロモーター領域に一般的に存在し、遺伝子の転写に重要な-10領域、-35領域、RBSは四角で囲んである。またRBSの中でも最も重要なSD配列(Shine and Dalgarno, Eur. J. Biochem. 57 221-230 (1975))は下線を引いてある。

【0089】

〔実施例10〕

ベクタープラスミドpTip-CH1.1、pTip-CH2.1、pTip-LCH1.1、pTip-LCH2.1の構築

実施例8及び9で述べたプラスミドpTip-CH1、pTip-CH2、pTip-LCH1、pTip-LCH2において、マルチクローニング部位のXhoI部位以降の読み枠を市販のpETベクター(Novagen社)の読み枠と一致させるために以下の作業を行った(図10)。

【0090】

プラスミドpTip-CH1をテンプレートとして、配列表中の配列番号21、104に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、TipA遺伝子プロモーターとマルチクローニング部位を含むDNAを得た。この0.3kbのDNA断片を制限酵素BsrGIとSpeIで二重消化し、pTip-CH1のBsrGI、SpeI部位にサブクローンした。結果得られたプラスミドにpTip-CH1.1と名前を付けた。

【0091】

プラスミドpTip-CH2をテンプレートとして、配列表中の配列番号21、104に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、TipA遺伝子プロモーターとマルチクロニング部位を含むDNAを得た。この0.3kbのDNA断片を制限酵素BsrGIとSpeIで二重消化し、pTip-CH1のBsrGI、SpeI部位にサブクローンした。結果得られたプラスミドにpTip-CH2.1と名前を付けた。

【0092】

プラスミドpTip-LCH1をテンプレートとして、配列表中の配列番号21、104に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、TipA-LG10プロモーターとマルチクロニング部位を含むDNAを得た。この0.3kbのDNA断片を制限酵素BsrGIとSpeIで二重消化し、pTip-CH1のBsrGI、SpeI部位にサブクローンした。結果得られたプラスミドにpTip-LCH1.1と名前を付けた。

【0093】

プラスミドpTip-LCH2をテンプレートとして、配列表中の配列番号21、104に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、TipA-LG10プロモーターとマルチクロニング部位を含むDNAを得た。この0.3kbのDNA断片を制限酵素BsrGIとSpeIで二重消化し、pTip-CH1のBsrGI、SpeI部位にサブクローンした。結果得られたプラスミドにpTip-LCH2.1と名前を付けた。

【0094】

〔実施例11〕

ベクタープラスミドpHN172、pHN173の構築

発現の誘導が厳密に調節されているかを調べるために以下のようなコントロール実験用プラスミドを作成した（図11）。

【0095】

pHN169をXbaIとSpeIで二重消化して得られた1.6kbのDNA断片をpHN144のXbaI部位にサブクローンした（サブクローンされた向きはDNAの5'方向からtsr遺伝子ORF-テトラサイクリン耐性遺伝子ORF-アンピシリン耐性遺伝子ORFである）。その結果できたプラスミドにpHN172と名前をつけた。

【0096】

次に、pHN153をBsrGIとXbaIで二重消化して得られた1.2kbのDNA断片をpHN144のBsrGI、SpeI部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドにpHN164と名前をつけた。次いで、pHN169をXbaIとSpeIで二重消化して得られた1.6kbのDNA断片をpHN164のXbaI部位にサブクローンした（サブクローンされた向きはDNAの5'方向からtsr遺伝子ORF-テトラサイクリン耐性遺伝子ORF-アンピシリン耐性遺伝子ORFである）。その結果できたプラスミドにpHN173と名前をつけた。

【0097】

pHN170は、TipA遺伝子プロモーター、その下流にPIP ORF、さらにその下流にThcA遺伝子転写終結配列、の3因子が連結された遺伝子カセット（以下Expression cassetteと表記）と、ThcA遺伝子プロモーター、その下流にTipA遺伝子、の2因子が連結された遺伝子カセット（以下Inducer cassetteと表記）両方をもつ。pHN173はExpression cassetteのみをもち、pHN172は両cassetteを持たない。

【0098】

〔実施例12〕

Rhodococcus属細菌の形質転換

Rhodococcus erythropolis JCM3201株をLB培地100mlにて対数増殖期に至るまで30℃で振とう培養する。培養液を30分間氷冷し、遠心分離し、菌体を回収する。これに100mlの氷冷滅菌水を加え、よく攪拌し、再び遠心分離し、菌体を回収する。これに100mlの氷冷10%グリセリン溶液を加え、よく攪拌し、遠心分離し、菌体を回収する。この氷冷10%グリセリン溶液での洗浄をもう一度繰り返し、菌体を5mlの氷冷10%グリセリン溶液に懸濁する。400 μ lずつ分注し、液体窒素で瞬間冷凍し、使用するまで-80℃にて保存した。-80℃から菌体を取り出し、氷上に融解し、プラスミドpHN170、またはpHN172、またはpHN173を3 μ l（それぞれ約300ng）加えた。この菌体とDNAの混合液をエレクトロポレーションキュベット（Bio-Rad社:0.2cm ギャップキュベット）に移し、同社の遺伝子導入装置ジーンパルサーIIを用いて、電場強度12.5kV/cmで、パルスコントローラーの設定はキャパシタンス25 μ F、外部抵抗400 Ω にてそれぞれ電気パルスを与えた。電気パルス処理した菌体とDNAの混合液を1mlのLB培地に混合し、30℃にて4時間培養した後集菌し、20 μ g/mlテトラサイクリン入りLB寒天培地（寒天は濃度1.8%）に塗布し

、30℃にて3日培養し、それぞれの形質転換体を得た。

【0099】

〔実施例13〕

Rhodococcus属細菌におけるPIP活性の測定1

構築された発現ベクターにはレポーター遺伝子としてPIP遺伝子が組み込まれており、チオストレプトンによる誘導性、誘導の強さなどを、PIPの酵素活性を測定することで、確認することができる。菌体中に存在するPIPの量は人工基質H-Pro-βNA (Bachem社製) を加水分解する活性を調べることで容易に定量が可能である。

【0100】

実施例12にて作成したRhodococcus erythropolis JCM3201株の形質転換体を8μg/mlのテトラサイクリンを含むLB培地で30℃にて培養し、600nmの波長で測定したオプティカルデンシティー (O.D.600) が0.6になった時点で、終濃度1μg/mlになるようにチオストレプトン (溶媒はジメチルスルホキシド) を加え、PIPの発現を誘導させた。

【0101】

16時間後に培養液の一部を取り出し、8μg/mlのテトラサイクリンを含むLB培地で200μlにメスアップし、60℃にて1分加温する。そこにPIPの基質として2μlのH-Pro-βNA (100mM:溶媒はジメチルスルホキシド) を加え60℃にて20分インキュベートする (PIPは60℃が至適温度)。PIPによってH-Pro-βNAから加水分解されて遊離したβNAを観察するために、発色剤として134μlのFast Garnet GBC Salt 溶液 (和光純薬社製で濃度0.5mg/ml : 1M酢酸ナトリウムバッファー (pH4.2)、10% Triton X-100が溶媒) を加える。PIPが発現していなければ上記混合液は黄色を呈するが、発現していれば赤色を呈する。また、呈色した赤色を分光光度計を用い、550nmでの吸光度 (A550) を測定し、PIP活性を定量した。測定はFastGarnet GBC Saltを加えた後、滅菌水666μlを加え希釈して行った。

【0102】

その際、550nmでは細胞のオプティカルデンシティーも測定してしまうので、550nmでの細胞のオプティカルデンシティー (O.D.550) は別測定し、測定時に使

用したO.D. 550に相当する値をA550の値から差し引いて補正した値をAc550とする。すなわち、 $Ac550 = A550 - O.D. 550 \times PIP$ の活性測定に使用した培養液量 (ml) で計算される。ユニット値は「20分間の測定で得られる、培養液1mlあたり、O.D. 600=1あたりのAc550の値」とし、「 $Ac550 \div PIP$ の活性測定に使った培養液量 (ml) $\div O.D. 600$ 」で計算した。

【0103】

pHN170で形質転換した細胞において、チオストレプトンを加えずに培養した場合は黄色を呈したが、加えた場合赤色を呈した。pHN172、pHN173で形質転換した細胞においては、チオストレプトンの有無に関わらず、黄色を呈した。

【0104】

実施例12にて作成したRhodococcus erythropolis JCM3201株の形質転換体を8 μ g/mlのテトラサイクリンを含むLB培地で30℃にて培養し、O.D. 600が2.0になったら、直ちに4℃に温度を下げ、菌体を馴化させるために、1時間振とう培養した。そこに終濃度1 μ g/mlになるようにチオストレプトンを加え、PIPの発現を誘導させた。40時間後に培養液の一部を取り出し、上記30℃と同様の実験を行った。

【0105】

pHN170で形質転換した細胞において、チオストレプトンを加えずに培養した場合は黄色を呈したが、加えた場合赤色を呈した。pHN172、pHN173で形質転換した細胞においては、チオストレプトンの有無に関わらず、黄色を呈した。

【0106】

以上の結果をまとめて図12に示す。

図12に示すようにRhodococcus erythropolis JCM3201株をpHN170、pHN172、pHN173で形質転換し、30℃、4℃でPIPを発現させた時と発現させない時、それぞれのPIP活性を測定した。図12には終濃度1 μ g/mlのチオストレプトンを加えたか否か (+または-)、活性値、培養温度、活性測定に使用した培養液量、形質転換したプラスミド、プラスミドの持つ「Cassette」の有無 (+または-) が示されている。

この結果から、広範な温度域において、チオストレプトンによって誘導可能な

発現ベクターが構築されたことが確認された。

【0107】

〔実施例14〕

Rhodococcus属細菌におけるPIP活性の測定2

実施例12にて作成したRhodococcus erythropolis JCM3201株をpHN170、pHN171で形質転換した細胞のPIP活性を実施例13に準じて測定した。

【0108】

図13に終濃度 $1\mu\text{g/ml}$ のチオストレプトンを加えてから時間を追ってPIP活性を測定した結果を示す。該図はRhodococcus erythropolis JCM3201株をpHN170で形質転換し、 30°C 、 4°C でPIPを発現させた時の活性を時間を追って測定したものを示す。図13中、縦軸はPIPの活性値(ユニット)、横軸は終濃度 $1\mu\text{g/ml}$ のチオストレプトンを加えてからの時間(分)を示す。 4°C の「○」はO.D.600が1.0の時に発現誘導開始させた時、「□」はO.D.600が2.0の時に発現誘導開始させた時の活性を示す。 30°C の「○」はO.D.600が0.6の時に発現誘導開始させた時、「□」はO.D.600が1.0の時に発現誘導開始させた時の活性を示す。

【0109】

また、図14に加えるチオストレプトンの終濃度を変化させて測定した結果を示すが、発現誘導時間は 4°C がO.D.600=2.0で誘導開始し、2400分(40時間)で、 30°C がO.D.600=0.6で誘導開始し、960分(16時間)である。図14に示す実施例においては、Rhodococcus erythropolis JCM3201株をpHN170で形質転換し、 30°C 、 4°C でPIPを発現させた時の活性を加えるチオストレプトンの濃度を変えて測定したものを示す。図14中、縦軸はPIPの活性値(ユニット)、横軸は培地中に添加したチオストレプトンの終濃度($\mu\text{g/ml}$)を示す。

【0110】

この結果から、発現誘導には 30°C でも 4°C でも、 $1\mu\text{g/ml}$ のチオストレプトンで十分なことが判明した。また、発現誘導の時期によるが、 30°C の場合は500から1000分(約8-16時間)程度、 4°C の場合は3000分(50時間)からそれ以上で細胞あたりのPIPの発現量は最大に達することが示された。

【0111】

〔実施例 15〕

Rhodococcus属細菌におけるPIP活性の測定 3

Rhodococcus erythropolis JCM3201株、Rhodococcus fascians JCM10002株、Rhodococcus opacus DSM44193株において実施例 12と同様にpHN170による形質転換を行った。その結果、pHN170によってRhodococcus erythropolisのみならず、Rhodococcus fascians、Rhodococcus opacusをも形質転換することができた。従って、pHN170中に導入された、Rhodococcus erythropolis JCM2895株由来の自律複製起点はRhodococcus fascians、Rhodococcus opacusにおいても機能することが示された。また、これらの形質転換体を用いて、実施例 13に準じてPIP活性を測定した。なお、いずれの菌株においても、発現誘導時間は4℃が0.D.600=2.0で誘導開始し、2400分（40時間）で、30℃が0.D.600= 0.6で誘導開始し、960分（16時間）である。結果を図 15に示す。図 15には、Rhodococcus erythropolis JCM3201株、Rhodococcus fascians JCM10002株、Rhodococcus opacus DSM44193株をpHN170で形質転換し、30℃、4℃でPIPを発現させた時と発現させない時、それぞれのPIP活性を測定した。図には終濃度1 μ g/mlのチオストレプトンを加えたか否か（+または-）、活性値、培養温度、活性測定に使用した培養液量、pHN170で形質転換された宿主、が示されている。

【0112】

pHN170で形質転換されたすべてのRhodococcus属細菌において、チオストレプトンを加えずに培養した場合は黄色を呈したが、加えた場合赤色を呈した。しかし、Rhodococcus fascians JCM10002株、Rhodococcus opacus DSM44193株においてはRhodococcus erythropolis JCM3201株に比べて発現は低かった。

【0113】

〔実施例 16〕

Rhodococcus属細菌における外来タンパク質の発現と精製 1

pHN170（実施例 7に記載）、pHN171（実施例 7に記載）を用いて、実施例 12と同様にRhodococcus erythropolis JCM3201株を形質転換し、実施例 13に準じてPIPを30℃、4℃でそれぞれ発現させた。ここでは、終濃度1 μ g/mlのチオストレプトンを加えた後、時間を追って菌体を回収し、PIPの精製を行った。PIPのC

末端には6×Hisタグがついており、Ni-NTA Superflow (Qiagen社製) を用いて、その使用説明書に準じて精製を行った。

【0114】

以下に具体的な精製法を示すが、精製の作業は4℃で行った。タンパク質を発現させた菌体 (20ml培養液分) を回収し、1mlのNT-Buffer (50mM Tris-HCl (pH8.0)、100mM塩化ナトリウム、1mMジチオスレイトール) に懸濁し、1gのガラスビーズ (直径0.105-0.125ミリメートル) を加えた。これをFast-prep FP120 (SAVANT社製) にて6m/秒の速度、20秒間往復振とうさせることで、細胞を破壊した。20,000×gにて遠心し、その上清700μlに、予めNT-Bufferで平衡化されたNi-NTA Superflowをベッド体積40μlになるように加えた。これを1時間回転撹拌しながらNi-NTA Superflowビーズと6×Hisタグのついたタンパク質とを結合させた。このビーズをNT-Bufferで4回洗浄した後、120μlのNTE-Buffer (50mM Tris-HCl (pH7.0)、100mM塩化ナトリウム、1mMジチオスレイトール、400mMイミダゾール) に3回懸濁することで、ビーズから6×Hisタグのついたタンパク質を溶出させた。

【0115】

上記サンプルのうち10μlを常法に従い、12% SDSポリアクリルアミド電気泳動に供した結果を図16に示す。Rhodococcus erythropolis JCM3201株をpHN170 (TipA遺伝子プロモーターからの発現: 左2枚の図)、pHN171 (TipA-LG10プロモーターからの発現: 右2枚の図) で形質転換し、4℃ (上2枚の図)、30℃ (下2枚の図) でPIPを発現させた。終濃度1μg/mlのチオストレプトンを加えてから、時間を追って菌体を回収し、PIPのC末端につけられた6×Hisタグを利用してNi-NTA Superflowを用いて精製した。菌体を回収した時間は4℃においては、0分 (一番左のレーン)、180分 (左から2番目のレーン)、420分 (左から3番目のレーン)、1080分 (左から4番目のレーン)、1440分 (左から5番目のレーン)、1860分 (左から6番目のレーン)、2520分 (左から7番目のレーン)、3060分 (左から8番目のレーン) で、30℃においては、0分 (1番左のレーン)、120分 (左から2番目のレーン)、240分 (左から3番目のレーン)、420分 (左から4番目のレーン)、540分 (左から5番目のレーン)、720分 (左から6番目のレーン) で、

ン)、900分(左から7番目のレーン)、1440分(左から8番目のレーン)である。図16の各図中、一番右のレーンは誘導せずに(すなわちチオストレプトンを加えずに)培養を続けた菌体から精製したサンプルを示す。30℃においては、TipA遺伝子プロモーターからの発現に比べるとTipA-LG10プロモーターからの発現は若干低かったが、4℃においては、逆にTipA-LG10プロモーターからの発現の方が高かった。また、TipA-LG10プロモーターにおいても発現の誘導は厳密にコントロールされていた。

両プロモーターからの発現量の詳細な比較は実施例18に詳しく述べる。

【0116】

〔実施例17〕

Rhodococcus属細菌における外来タンパク質の発現と精製2

pHN170(実施例7に記載)、pHN171(実施例7に記載)を用いて、実施例12と同様にRhodococcus erythropolis JCM3201株を形質転換し、実施例13に準じてPIPを32℃、30℃、15℃、4℃でそれぞれ発現させた。なお、発現誘導時間は4℃が0.D.600=2.0で誘導開始し、2400分(40時間)で、15℃が0.D.600=1.0で誘導開始し、1500分(25時間)で、30℃が0.D.600=0.6で誘導開始し、960分(16時間)で、32℃が0.D.600=0.6で誘導開始し、960分(16時間)である。加えたチオストレプトンは終濃度1μg/mlである。精製は実施例16と同様に行った。

【0117】

上記サンプルのうち10μlを常法に従い、12% SDSポリアクリルアミド電気泳動に供した結果を図17に示す。Rhodococcus erythropolis JCM3201株をpHN170(TipA遺伝子プロモーターからの発現:レーン1、3、5、7)、pHN171(TipA-LG10プロモーターからの発現:レーン2、4、6、8)で形質転換し、4℃(レーン7、8)、15℃(レーン5、6)、30℃(レーン3、4)、32℃(レーン1、2)、でPIPを発現させた。PIPのC末端につけられた6×Hisタグを利用してNi-NTA Superflowを用いて精製した。

【0118】

32℃から4℃の広範な温度域において、TipA遺伝子プロモーター、並びにTipA-LG10プロモーターからのPIPの発現が確認された。32℃、30℃においてはTipAプ

ロモーターからのPIPの発現量の方が多かったが、15℃、4℃においてはTipA-LG10プロモーターからの発現の方が多かった。

【0119】

〔実施例18〕

Rhodococcus属細菌における外来タンパク質の発現と精製3

PIP以外のタンパク質も該発現ベクターを用いて、発現させることができるかどうか調べるために、以下の実験を行った。

【0120】

プラスミドpRSET-ATPIPをテンプレートとして、配列表中の配列番号48、49に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、Arabidopsis thaliana由来PIP遺伝子 (Tamura et al., FEBS Lett. 398 101-105 (1996): 以下AtPIPと略記) を含むDNAを得た。この1.0kbのDNA断片を制限酵素NcoIとXhoIで二重消化し、pTip-CH1、並びにpTip-LCH1のNcoI、XhoI部位にそれぞれサブクローンした結果、TipA遺伝子プロモーターもしくはTipA-LG10プロモーターの制御下に置かれたAtPIP遺伝子 (6×HisタグをC末端に持つ) を含むプラスミドが作成され、pHN176、pHN177とそれぞれ名前を付けた。

【0121】

プラスミドpTrc99a-GFPをテンプレートとして、配列表中の配列番号50、51に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、Aequorea victoria由来蛍光緑色タンパク質をコードする遺伝子 (以下GFPと略記) を含むDNAを得た。0.8kbのDNA断片を制限酵素BspHIとSmaIで二重消化し、pTip-NH1並びにpTip-LNH1のNcoI、SmaI部位にそれぞれサブクローンした結果、TipA遺伝子プロモーターもしくはTipA-LG10プロモーターの制御下に置かれたGFP (6×HisタグをN末端に持つ) 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN187、pHN186とそれぞれ名前を付けた。

【0122】

プラスミドpGEX-2T (アマシャムバイオサイエンス社) をテンプレートとして、配列表中の配列番号52、53に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、グルタチオン-S-トランスフェラーゼタンパク質をコード

する遺伝子（以下GSTと略記）を含むDNAを得た。0.7kbのDNA断片を制限酵素NcoIとXhoIで二重消化し、pTip-NH2、並びにpTip-LNH2のNcoI、XhoI部位にそれぞれサブクローンした結果、TipA遺伝子プロモーターもしくはTipA-LG10プロモーターの制御下に置かれたGST遺伝子（6×HisタグをN末端に持つ）を含むプラスミドが作成され、pHN282、pHN283とそれぞれ名前を付けた。

【0123】

pHN170（実施例7に記載）、pHN171（実施例7に記載）、pHN176、pHN177、pHN187、pHN186、pHN282、pHN283を用いて、実施例12と同様にRhodococcus erythropolis JCM3201株を形質転換し、実施例13に準じてPIP、AtPIP、GFP、GST各タンパク質を30℃、4℃でそれぞれ発現させた。いずれも、発現誘導時間は4℃がO.D.600=2.0で誘導開始し、2400分（40時間）で、30℃がO.D.600=0.6で誘導開始し、960分（16時間）で、加えたチオストレプトンは終濃度1μg/mlである。なお、4℃では50ml、30℃では20mlの培養液から精製を行った。

上記4種のタンパク質には全て6×Hisタグがついており、実施例16に準じて精製を行った。

【0124】

上記サンプルのうち10μlを常法に従い、12% SDSポリアクリルアミド電気泳動に供した結果を図18に示す。Rhodococcus erythropolis JCM3201株をpHN170（TipA遺伝子プロモーターの下流にPIP：レーン1、9）、pHN171（TipA-LG10プロモーターの下流にPIP：レーン2、10）、pHN176（TipA遺伝子プロモーターの下流にAtPIP：レーン3、11）、pHN177（TipA-LG10プロモーターの下流にAtPIP：レーン4、12）、pHN187（TipA遺伝子プロモーターの下流にGFP：レーン5、13）、pHN186（TipA-LG10プロモーターの下流にGFP：レーン6、14）、pHN282（TipA遺伝子プロモーターの下流にGST：レーン7、15）、pHN283（TipA-LG10プロモーターの下流にGST：レーン8、16）で形質転換し、4℃（レーン9から16）30℃（レーン1から8）で各タンパク質を発現させた。各タンパク質の末端につけられた6×Hisタグを利用してNi-NTA Superflowを用いて精製した。

【0125】

また、デンストメーターにてバンドの密度を測定し、定量した結果を図19に

示すが、これは図18で示されたSDSポリアクリルアミド電気泳動像のバンドから定量したものである。該図では、それぞれの外来タンパク質が1リットルの培養液からどれだけ精製されたかを示す。単位はmgで示されている。一番右のカラム（倍率）は、TipA遺伝子プロモーターを用いて発現させた場合に比べて、TipA-LG10プロモーターを用いて発現させた場合、何倍のタンパク質が精製されるか示されている。この結果、4℃において、TipA遺伝子プロモーターよりもTipA-LG10プロモーターから発現させる方が、得られる組み換えタンパク質の量が多いことがわかった。しかし、30℃の場合は必ずしもTipA-LG10プロモーターから発現させる方が、得られる組み換えタンパク質の量が多いとは限らなかった。

【0126】

〔実施例19〕

大腸菌に対して30℃で増殖阻害効果を示すマウス由来タンパク質の分離

具体的にどの遺伝子が発現されると宿主に対して増殖阻害効果を示すのかを調べるために、マウス肝臓由来のPoly(A)+RNA (STRATAGENE社製) を用いて大腸菌用発現ライブラリーを構築した。以下に具体的に述べる。

【0127】

大腸菌用発現ベクターはアラビノース誘導性ベクターを用いることとした。まず該ベクター、pBAD/HisA (Invitrogen社製) において、cDNAの導入を容易にするために、マルチクローニング部位を改変したpBAD-Linkerを作成した。以下にその作成過程を述べる。配列表中の配列番号54、55に記載の合成オリゴデオキシリボヌクレオチド (EcoRI、BglII、XhoI認識部位からなるクローニング配列を含み、お互いに相補的な配列を持つ) を等モル量ずつ混合し、70℃で10分処理し、20分かけて室温に冷却し、2本鎖化させた。結果、その末端はNcoIとHindIIIで二重消化されたベクターと連結可能な状態になり、これをpBAD/HisAのNcoI、HindIII部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドにpBAD-Linkerと名前をつけた。

【0128】

STRATAGENE社製cDNA synthesis kitを用い、その使用説明書に従って、上記Poly(A)+RNAより2本鎖cDNAを合成した。次いで、このcDNAをpBAD-LinkerのEcoRI

、XhoI部位にライゲーションした。このライゲーション産物を常法に従い、大腸菌TOP10 (Invitrogen社製) に形質転換し、50 μ g/mlアンピシリン入りLB寒天培地上にて、5万個の形質転換体を得た。その寒天培地のレプリカを50 μ g/mlアンピシリンと0.2% L-アラビノースを含んだLB寒天培地にGenHunter社製Easy Transfer Replica Plating Deviceを用いて作成し、タンパク質の発現を誘導させ、30℃にて一晩インキュベートした。その結果、アラビノースを含まない培地上では生育できるが、アラビノースを含む培地上では生育できないコロニーが426個選別された。

【0129】

この426個のTOP10形質転換体を1.5mlの50 μ g/mlアンピシリン入りLB培地にて培養した後、常法に従いプラスミドを分離、精製した。得られたプラスミドは制限酵素EcoRI、XhoIの二重消化後、1%アガロース電気泳動に供し、マウス由来のcDNA断片の長さを見積もった。さらに、得られたプラスミドは配列表中の配列番号56記載の合成オリゴデオキシリボヌクレオチド用い、DNAシーケンサーABI PRISM(R) 3100 Genetic Analyzerにて、マウス由来cDNA部分の塩基配列を約500塩基決定した。その結果を図20に示す。該図はBLASTプログラムを用いて、決定されたDNA配列を元に相同性検索を行い、遺伝子を同定した結果を示す。

【0130】

〔実施例20〕

Rhodococcus属細菌、並びに大腸菌における外来タンパク質の発現と精製

実施例19にて分離した遺伝子のうち、Serum amyloid A (Saal)、NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex 4、Cytochrome b5 like、RIKEN1500015G18、Transferrin、Apolipoprotein A-V、Pantotenate kinase 1 β 、Peroxisredoxin 4、RIKEN1300017J02 (Transferrin Homolog)をRhodococcus erythropolis JCM3201と大腸菌TOP10を宿主として発現させた。また、以下の4群、10種類のタンパク質も同様に発現させた。1群) 大腸菌で発現させると不活性な封入体となることが知られている3種類のプロテアーゼ、Cathepsin D、Prothrombin、Kallikrein 6、2群) その生理活性から大腸菌での発現が困難だと予想される2種類のDNase、LSDNase、DLAD、3群) 他のグループの研究で、その細胞増殖阻害活性

により大腸菌での発現が困難だとされているもの、HMG-1、Kid1、Bax alpha、4群) 他のグループの研究で、低温依存的に可溶化されるとされているもの、Glucokinase、p37A。なお、Rhodococcus erythropolisにおいては30℃と4℃で、大腸菌は30℃で組み換えタンパク質をそれぞれ発現させた。以下に詳しく述べる。

【0131】

プラスミドLE20をテンプレートとして、配列表中の配列番号57、58に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、マウス由来Serum Amyloid Protein A タンパク質 (Meeker et al., Proteins 30 381-387 (1998)) をコードするSaal遺伝子 (GenBank受入番号M11131) を含むDNAを得た。このDNA断片を制限酵素NdeIとXhoIで二重消化し、pTip-LNH1のNdeI、XhoI部位にサブクローンした結果、TipA-LG10プロモーターの制御下に置かれたSaal遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN205と名前を付けた。また、プラスミドLE20をテンプレートとして、配列表中の配列番号59、60に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、マウス由来Saal遺伝子を含むDNAを得た。このDNA断片を制限酵素XhoIとKpnIで二重消化し、pBAD/HisAのXhoI、KpnI部位にサブクローンした結果、アラビノース誘導性プロモーターの制御下に置かれたSaal遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN193と名前を付けた。

【0132】

プラスミドL113をテンプレートとして、配列表中の配列番号61、62に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、マウス由来NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex 4をコードする遺伝子 (Walker et al., J. Mol. Biol. 226 1051-1072 (1992) : GenBank受入番号BC011114 : 以下NADH4と略記) を含むDNAを得た。このDNA断片を制限酵素NdeIとEcoRIで二重消化し、pTip-LNH1のNdeI、EcoRI部位にサブクローンした結果、TipA-LG10プロモーターの制御下に置かれたNADH4遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN206と名前を付けた。また、プラスミドL113をテンプレートとして、配列表中の配列番号63、62に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、マウス由来NADH4遺伝子を含むDNAを得た。このDNA断片を制限酵素XhoIとEcoRIで二重消化し、pBAD/HisAのXhoI、EcoRI部位にサブクローンした結果、アラビノース誘導性プロ

モーターの制御下に置かれたNADH遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN195と名前を付けた。

【0133】

プラスミドL3をテンプレートとして、配列表中の配列番号64、65に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、マウス由来Cytochrome b5 likeタンパク質をコードする遺伝子（GenBank受入番号AK002426：以下Cytochrome b5lと略記）を含むDNAを得た。このDNA断片を制限酵素NdeIとEcoRIで二重消化し、pTip-LNH1のNdeI、EcoRI部位にサブクローンした結果、TipA-LG10プロモーターの制御下に置かれたCytochrome b5l遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN208と名前を付けた。また、プラスミドL3をテンプレートとして、配列表中の配列番号66、65に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、マウス由来Cytochrome b5l遺伝子を含むDNAを得た。このDNA断片を制限酵素XhoIとEcoRIで二重消化し、pBAD/HisAのXhoI、EcoRI部位にサブクローンした結果、アラビノース誘導性プロモーターの制御下に置かれたCytochrome b5l遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN199と名前を付けた。

【0134】

プラスミドLE123をテンプレートとして、配列表中の配列番号67、68に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、マウス由来機能不明な推定上のタンパク質をコードする遺伝子（GenBank受入番号NM#025439：以下LE123と略記）を含むDNAを得た。このDNA断片を制限酵素NdeIとEcoRIで二重消化し、pTip-LNH1のNdeI、EcoRI部位にサブクローンした結果、TipA-LG10プロモーターの制御下に置かれたLE123遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN287と名前を付けた。また、プラスミドLE123をテンプレートとして、配列表中の配列番号69、68に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、マウス由来LE123遺伝子を含むDNAを得た。このDNA断片を制限酵素XhoIとEcoRIで二重消化し、pBAD/HisAのXhoI、EcoRI部位にサブクローンした結果、アラビノース誘導性プロモーターの制御下に置かれたLE123遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN276と名前を付けた。

【0135】

プラスミドLE280をテンプレートとして、配列表中の配列番号70、71に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、マウス由来Transferrinをコードする遺伝子(Mason et al., Protein Expr. Purif. 23 142-150 (2001): GenBank受入番号BC022986)を含むDNAを得た。このDNA断片を制限酵素NdeIとHindIIIで二重消化し、pTip-LNH1のNdeI、HindIIIで部位にサブクローンした結果、TipA-LG10プロモーターの制御下に置かれたTransferrin遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN289と名前を付けた。また、プラスミドLE280をテンプレートとして、配列表中の配列番号72、71に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、マウス由来Transferrin遺伝子を含むDNAを得た。このDNA断片を制限酵素XhoIとHindIIIで二重消化し、pBAD/HisAのXhoI、HindIII部位にサブクローンした結果、アラビノース誘導性プロモーターの制御下に置かれたTransferrin遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN277と名前を付けた。

【0136】

プラスミドLE295をテンプレートとして、配列表中の配列番号73、74に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、マウス由来Apolipoprotein A-Vをコードする遺伝子(van der Vliet et al., J. Biol. Chem. 276 44512-44520 (2001): GenBank受入番号NM#080434:以下Apoa5と略記)を含むDNAを得た。このDNA断片を制限酵素NcoIとEcoRIで二重消化し、pTip-LNH2のNcoI、EcoRI部位にサブクローンした結果、TipA-LG10プロモーターの制御下に置かれたApoa5遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN288と名前を付けた。また、プラスミドLE295をテンプレートとして、配列表中の配列番号75、74に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、マウス由来Apoa5遺伝子を含むDNAを得た。このDNA断片を制限酵素XhoIとEcoRIで二重消化し、pBAD/HisAのXhoI、EcoRI部位にサブクローンした結果、アラビノース誘導性プロモーターの制御下に置かれたApoa5遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN281と名前を付けた。

【0137】

マウス肝臓Poly(A)+RNAを用いて、配列表中の配列番号76、77に記載のプ

ライマーにて、RT-PCR (Larrick, Trends Biotechnol. 10 146-152 (1992)) による増幅を行った。RT-PCRにはSTRATAGENE社製のProSTAR Ultra HF RT-PCR Systemを用い、その使用説明書通りに行った(以下全てのRT-PCRは同キットを用いて行った)。その結果、マウス由来Cathepsin D遺伝子(Grusby et al., Nucleic Acids Res. 18 4008 (1990)、Babe et al., Biotechnology and Genetic Engineering Reviews 17 213-252 (2000): GenBank受入番号X52886)を含むDNAを得た。このDNA断片を制限酵素NcoIとXhoIで二重消化し、pTip-LCH1のNcoI、XhoI部位にサブクローンした結果、TipA-LG10プロモーターの制御下に置かれたCathepsin D遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN270と名前を付けた。また、pHN270をNcoIとSalIで二重消化して得られた1.2kbのDNA断片をpBAD/HisAのNcoI、XhoI部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドにpHN273と名前をつけた。

【0138】

マウス肝臓Poly(A)+RNAを用いて、配列表中の配列番号78、79に記載のライマーにて、RT-PCRによる増幅を行った。その結果、マウス由来Prothrombin遺伝子(Degen et al., DNA Cell Biol. 9 487-498 (1990): GenBank受入番号X52308)を含むDNAを得た。このDNA断片を制限酵素NcoIとXhoIで二重消化し、pTip-LCH1のNcoI、XhoI部位にサブクローンした結果、TipA-LG10プロモーターの制御下に置かれたProthrombin遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN271と名前を付けた。

【0139】

マウス肝臓Poly(A)+RNAを用いて、配列表中の配列番号80、81に記載のライマーにて、RT-PCRによる増幅を行った。その結果、マウス由来Kallikrein 6遺伝子(Evans et al., J. Biol. Chem. 262 8027-8034 (1987)、Babe et al., Biotechnology and Genetic Engineering Reviews 17 213-252 (2000): GenBank受入番号NM#010639)を含むDNAを得た。このDNA断片を制限酵素NcoIとXhoIで二重消化し、pTip-LCH1のNcoI、XhoI部位にサブクローンした結果、TipA-LG10プロモーターの制御下に置かれたKallikrein6遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN272と名前を付けた。また、pHN272をNcoIとSalIで二重消化して得られた0.7kbのDNA断片をpBAD/HisAのNcoI、XhoI部位にサブクローンした。その結果できたプ

ラスミドにpHN275と名前をつけた。

【0140】

マウス肝臓Poly(A)+RNAを用いて、配列表中の配列番号82、83に記載のプライマーにて、RT-PCRによる増幅を行った。その結果、マウス由来LSDNase遺伝子 (Baron et al., Gene 215 291-301 (1998): GenBank受入番号AF047355) を含むDNAを得た。このDNA断片を制限酵素NdeIとXhoIで二重消化し、pTip-LNH1のNdeI、XhoI部位にサブクローンした結果、TipA-LG10プロモーターの制御下に置かれたLSDNase遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN299と名前を付けた。

【0141】

マウス肝臓Poly(A)+RNAを用いて、配列表中の配列番号84、85に記載のプライマーにて、RT-PCRによる増幅を行った。その結果、マウス由来DLAD遺伝子 (Shiokawa and Tanuma, Nucleic Acids Res. 27 4083-4089 (1999): GenBank受入番号AF128888) を含むDNAを得た。このDNA断片を制限酵素NcoIとEcoRIで二重消化し、pTip-LNH2のNcoI、EcoRI部位にサブクローンした結果、TipA-LG10プロモーターの制御下に置かれたDLAD遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN284と名前を付けた。

【0142】

マウス肝臓Poly(A)+RNAを用いて、配列表中の配列番号86、87に記載のプライマーにて、RT-PCRによる増幅を行った。その結果、マウス由来HMG-1遺伝子 (Pauken et al., Mamm. Genome 5 91-99 (1994)、Lee et al., Gene 225 97-105 (1998): GenBank受入番号U00431) を含むDNAを得た。このDNA断片を制限酵素NcoIとEcoRIで二重消化し、pTip-LNH2のNcoI、EcoRI部位にサブクローンした結果、TipA-LG10プロモーターの制御下に置かれたHMG-1遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN285と名前を付けた。また、プラスミドpHN285をテンプレートとして、配列表中の配列番号88、87に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、マウス由来HMG-1遺伝子を含むDNAを得た。このDNA断片を制限酵素XhoIとEcoRIで二重消化し、pBAD/HisAのXhoI、EcoRI部位にサブクローンした結果、アラビノース誘導性プロモーターの制御下に置かれたHMG-1遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN305と名前を付けた。

【0143】

マウス肝臓Poly(A)+RNAを用いて、配列表中の配列番号89、90に記載のプライマーにて、RT-PCRによる増幅を行った。その結果、マウス由来Kidl遺伝子 (Tekki-Kessaris et al., Gene 240 13-22 (1999)、Suter-Crazzolara and Unsicker Bio/Technology 19 202-204 (1995): GenBank受入番号AF184111) を含むDNAを得た。このDNA断片を制限酵素NcoIとHindIIIで二重消化し、pTip-LNH2のNcoI、HindIII部位にサブクローンした結果、TipA-LG10プロモーターの制御下に置かれたKidl遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN286と名前を付けた。

【0144】

マウス肝臓Poly(A)+RNAを用いて、配列表中の配列番号91、92に記載のプライマーにて、RT-PCRによる増幅を行った。その結果、マウス由来Bax_alpha遺伝子 (Oltvai et al., Cell 74 609-619 (1993)、Donnelly et al., Protein Expr. Purif. 22 422-429 (2001): GenBank受入番号L22472) を含むDNAを得た。このDNA断片を制限酵素NdeIとEcoRIで二重消化し、pTip-LNH1のNdeI、EcoRI部位にサブクローンした結果、TipA-LG10プロモーターの制御下に置かれたBax_alpha遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN217と名前を付けた。また、プラスミドpHN217をテンプレートとして、配列表中の配列番号93、92に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、マウス由来Bax_alpha遺伝子を含むDNAを得た。このDNA断片を制限酵素XhoIとEcoRIで二重消化し、pBAD/HisAのXhoI、EcoRI部位にサブクローンした結果、アラビノース誘導性プロモーターの制御下に置かれたBax_alpha遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN212と名前を付けた。

【0145】

マウス肝臓Poly(A)+RNAを用いて、配列表中の配列番号94、95に記載のプライマーにて、RT-PCRによる増幅を行った。その結果、マウス由来Glucokinase遺伝子 (Lin et al., Protein Expr. Purif. 1 169-176(1990): GenBank受入番号BC011139) を含むDNAを得た。このDNA断片を制限酵素NdeIとXhoIで二重消化し、pTip-LNH1のNdeI、XhoI部位にサブクローンした結果、TipA-LG10プロモーターの制御下に置かれたGlucokinase遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN298と

名前を付けた。また、pHN298をNcoIとXhoIで二重消化して得られた1.4kbのDNA断片をpBAD/HisAのNcoI、XhoI部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドにpHN306と名前をつけた。

【0146】

pET22b-Dmp37Aを用いて、配列表中の配列番号105、96に記載のプライマーにて、PCRによる増幅を行った。その結果、Drosophila melanogaster由来p37Aをコードする遺伝子 (Holzl et al., J. Cell Biol. 150 119-129 (2000) : GenBank受入番号AF145312) を含むDNAを得た。このDNA断片を制限酵素NdeIとXhoIで二重消化し、pTip-LCH2のNdeI、XhoI部位にサブクローンした結果、TipA-LG10プロモーターの制御下に置かれたp37A遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN291と名前を付けた。また、プラスミドpHN291をテンプレートとして、配列表中の配列番号97、25に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、Drosophila melanogaster由来p37A遺伝子を含むDNAを得た。このDNA断片を制限酵素SalIで消化後、NcoIで部分消化し (p37A内部のNcoIで切断しないように)、pBAD/HisAのNcoI、XhoI部位にサブクローンした結果、アラビノース誘導性プロモーターの制御下に置かれたp37A遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN308と名前を付けた。

【0147】

プラスミドLE59をテンプレートとして、配列表中の配列番号98、99に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、マウス由来Pantothenate kinase 1 betaタンパク質をコードする遺伝子 (Rock et al., J. Biol. Chem. 275 1377-1383 (2000) : GenBank受入番号AF200357 : 以下PanKと略記) を含むDNAを得た。このDNA断片を制限酵素XhoIとEcoRIで二重消化し、pBAD/HisAのXhoI、EcoRI部位にサブクローンした結果、アラビノース誘導性プロモーターの制御下に置かれたPanK遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN279と名前を付けた。

【0148】

マウス肝臓Poly(A)+RNAを用いて、配列表100、101に記載のプライマーにて、RT-PCRによる増幅を行った。その結果、マウス由来Peroxiredoxin 4をコ

ードする遺伝子 (GenBank受入番号BC019578) を含むDNAを得た。このDNA断片を制限酵素XhoIとKpnIで二重消化し、pBAD/HisAのXhoI、KpnI部位にサブクローンした結果、アラビノース誘導性プロモーターの制御下に置かれたPeroxioredoxin 4遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN278と名前を付けた。

【0149】

プラスミドLE156をテンプレートとして、配列表中の配列番号102、103に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、マウス由来Ttransferrin様タンパク質をコードする遺伝子 (GenBank受入番号AK005035: 以下TFLと略記) を含むDNAを得た。このDNA断片を制限酵素XhoIとEcoRIで二重消化し、pBAD/HisAのXhoI、EcoRI部位にサブクローンした結果、アラビノース誘導性プロモーターの制御下に置かれたTFL遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN280と名前を付けた。

【0150】

また、上述したタンパク質のうち、シグナルペプチドを持つものは全てシグナルペプチドをコードするDNA配列を除いてサブクローンされている。また、Prothrombinは成熟Thrombinになる直前の「Prethrombin-2」をコードするDNA配列 (Soejima et al., J. Biochem. 130 269-277 (2001)) がサブクローンされている。

【0151】

pHN171 (実施例7に記載)、pHN205、pHN206、pHN208、pHN287、pHN289、pHN288、pHN270、pHN271、pHN272、pHN299、pHN284、pHN285、pHN286、pHN217、pHN298、pHN291を用いて、実施例12と同様にRhodococcus erythropolis JCM3201株を形質転換し、実施例13に準じて各タンパク質を30℃、4℃でそれぞれ発現させた。

【0152】

これらのタンパク質には全て6×Hisタグが末端についており、実施例16と同様に精製を行った。またこれに加え、今回は細胞破壊後に20,000×gにて遠心してできた沈殿 (実施例16に記載) からも精製を行った。具体的に以下に沈殿物からの精製法を示すが、その作業は室温で行った。1mlのDN-Buffer (50mM Tris-HCl (pH8.0)、8M尿素) に沈殿物を懸濁し、20,000×gにて遠心し、その上清700μ

1に、予めDN-Bufferで平衡化されたNi-NTA Superflowをベッド体積40 μ lになるように加えた。これを1時間回転攪拌しながらNi-NTA Superflowビーズと6 \times Hisタグのついたタンパク質とを結合させた。このビーズをDN-Bufferで4回洗浄した後、120 μ lのDNE-Buffer(50mM Tris-HCl (pH7.0)、8M尿素、400mMイミダゾール)に3回懸濁することで、ビーズから6 \times Hisタグのついたタンパク質を溶出させた。

【0153】

pBAD/His/lacZ (Invitrogen社)、pHN193、pHN195、pHN199、pHN276、pHN277、pHN281、pHN273、pHN275、pHN305、pHN212、pHN306、pHN308、pHN279、pHN278、pHN280を用い、Invitrogen社のpBAD/Hisキットの使用説明書の通りに、大腸菌にてタンパク質の発現を行った。

【0154】

以下に具体的な精製法を示す。タンパク質を発現させた菌体を回収し、1mlのNT-Bufferに懸濁した。これを超音波発生器 UD-20 (TOMY社製)を用いて細胞を破壊した。20,000 \times gにて遠心し、その上清900 μ lに、予め、NT-Bufferで平衡化されたNi-NTA Superflowをベッド体積40 μ lになるように加えた。これを1時間回転攪拌しながらNi-NTA Superflowビーズと6 \times Hisタグのついたタンパク質とを結合させた。このビーズをNT-Bufferで4回洗浄した後、120 μ lのNTE-Bufferに3回懸濁することで、ビーズから6 \times Hisタグのついたタンパク質を溶出させた。上記の作業はすべて4 $^{\circ}$ Cで行った。

【0155】

また、細胞破壊後、20,000 \times gにて遠心してできた沈殿からも精製を行ったが、その作業工程は上述した方法と同様である。

【0156】

上記サンプルのうち10 μ lを常法に従い12% SDSポリアクリルアミド電気泳動に供し、デンストメーターにてバンドの密度を測定し、定量した結果を図21に示す。該図において、左から2番目のカラムは発現させたタンパク質の名前を示す。左から3番目のカラムは発現させたタンパク質のN末端、C末端どちらに6 \times Hisタグを付けたかを示す。左から4番目のカラムは、シグナル配列等を含めた完全

長のタンパク質の推定分子量 (kDa) を示すが、括弧内の数字は実際に発現させたタンパク質部分の推定分子量を示す。左から5、9番目のカラムはタンパク質を発現させた時に用いたプラスミドの名前を示す。左から6、8、10番目のカラムは1リットルの培養液あたり、得られた組み換えタンパク質の質量を示すが (単位はミリグラム)、20,000×gでの上清画分 (Sup) から精製したときと、沈殿画分 (Ppt) から精製したときとに分けて示してある。左から7、11番目のカラム中の+、-はそれぞれの形質転換体を発現誘導剤 (Rhodococcus erythropolisの場合は1μg/mlのチオストレプトン、大腸菌の場合は0.2% L-アラビノース) を含んだ寒天培地上に塗布した時の、増殖の速度を表している。最も早く増殖した形質転換体が+++で、全く増殖しなかった形質転換体が-である。また、用いた宿主、発現誘導時の温度が最上部に示されている。N.D. (Not Detected)は検出限界以下だったことを示す。

【0157】

表1に実施例で用いた各プラスミドのリストを、表2に実施例で用いた菌株のリストを示す。

【0158】

【表1】

カテゴリー	プラスミド名	備考	ソース
市販のクローニングベクター	pBluescript II SK (+)	Conventional vector for general cloning	Stratagene
	pGEM 3Z (f) +	Conventional vector for general cloning	Promega
発現ベクターのソース	pRE2895	Source of RepA18 (Cryptic plasmid isolated from <i>R. erythropolis</i>)	This study
	pHN136	Backbone of the expression vector	This study
	pHN143	Source of Thio'	This study
	pHN62	Source of ALDH-TipA (Inducer cassette)	This study
	pHN153	Source of TipA-PIP ORF-ALDH1 (Expression)	This study
	pHN169	Source of Tufp-Tet'	This study
コントロールプラスミド	pHN172	Neither Expression cassette nor inducer cassette	This study
	pHN173	Expression cassette, but no inducer cassette	This study
<i>R. erythropolis</i> 中の発現プラスミド (標的遺伝子含まず)	pTip-NH1	TipAp, 6xHis at N-terminus, MCS type1	This study
	pTip-CH1	TipAp, 6xHis at C-terminus, MCS type1	This study
	pTip-NH2	TipAp, 6xHis at N-terminus, MCS type2	This study
	pTip-CH2	TipAp, 6xHis at C-terminus, MCS type2	This study
	pTip-LNH1	TipA-LG10p, 6xHis at N-terminus, MCS type1	This study
	pTip-LCH1	TipA-LG10p, 6xHis at C-terminus, MCS type1	This study
	pTip-LNH2	TipA-LG10p, 6xHis at N-terminus, MCS type2	This study
	pTip-LCH2	TipA-LG10p, 6xHis at C-terminus, MCS type2	This study
	pTip-CH1.1	TipAp, 6xHis at N-terminus, MCS type3	This study
	pTip-CH2.1	TipAp, 6xHis at C-terminus, MCS type3	This study
	pTip-LCH1.1	TipA-LG10p, 6xHis at N-terminus, MCS type3	This study
	pTip-LCH2.1	TipA-LG10p, 6xHis at C-terminus, MCS type3	This study
<i>R. erythropolis</i> 中の発現プラスミド (標的遺伝子含む)	pHN170	Target=PIP in pTip-CH1	This study
	pHN171	Target=PIP in pTip-LCH1	This study
	pHN176	Target=AIPIP in pTip-CH1	This study
	pHN177	Target=AIPIP in pTip-LCH1	This study
	pHN187	Target=GFP in pTip-NH1	This study
	pHN186	Target=GFP in pTip-LNH1	This study
	pHN282	Target=GST in pTip-NH2	This study
	pHN283	Target=GST in pTip-LNH2	This study
	pHN205	Target=Saa1 in pTip-LNH1	This study
	pHN206	Target=NADH4 in pTip-LNH1	This study
	pHN208	Target=Cytochrome b51 in pTip-LNH1	This study
	pHN287	Target=LEI23 in pTip-LNH1	This study
	pHN289	Target=Transferrin in pTip-LNH1	This study
	pHN288	Target=Apaa5 in pTip-LNH2	This study
	pHN270	Target=Cathepsin D in pTip-LCH1	This study
	pHN271	Target=Prothrombin in pTip-LCH1	This study
	pHN272	Target=Kallikrein6 in pTip-LCH1	This study
	pHN299	Target=LSDase in pTip-LNH1	This study
	pHN284	Target=DLAD in pTip-LNH2	This study
	pHN285	Target=MG-1 in pTip-LNH2	This study
	pHN286	Target=Kid1 in pTip-LNH2	This study
<i>E. coli</i> 中の発現プラスミド (標的遺伝子含む)	pBAD/HisA	BAD promoter, 6xHis at N-terminus, Xpress Epitope, MCS	Invitrogen
	pBAD-Linker	BAD promoter, for library construction	This study
	pHN193	Target=Saa1 in pBAD/HisA	This study
	pHN195	Target=NADH4 in pBAD/HisA	This study
	pHN199	Target=Cytochrome b51 in pBAD/HisA	This study
	pHN276	Target=LEI23 in pBAD/HisA	This study
	pHN277	Target=Transferrin in pBAD/HisA	This study
	pHN281	Target=Apaa5 in pBAD/HisA	This study
	pHN273	Target=Cathepsin D in pBAD/HisA	This study
	pHN275	Target=Kallikrein6 in pBAD/HisA	This study
	pHN305	Target=MG-1 in pBAD/HisA	This study
	pHN212	Target=Bax alpha in pBAD/HisA	This study
	pHN306	Target=Glucokinase in pBAD/HisA	This study
	pHN308	Target=p37A in pBAD/HisA	This study
<i>E. coli</i> 中の発現プラスミド (標的遺伝子含む)	pHN279	Target=PanK in pBAD/HisA	This study
	pHN278	Target=Peroxiredoxin4 in pBAD/HisA	This study
	pHN280	Target=TrL in pBAD/HisA	This study
	pBAD/His/lacZ	Target=lacZ	Invitrogen

【0159】

【表2】

種	株名	別名	ソース	使用
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	JCM2895	ATCC15962	Japan Collection of Microorganisms	Source of pRE2895 (Source of RepA&B)
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	JCM3201	ATCC4277	Japan Collection of Microorganisms	Host strain to express recombinant proteins Source of ALDHP Source of ALDHT
<i>Rhodococcus fascians</i>	JCM10002	ATCC12974	Japan Collection of Microorganisms	Host strain to express recombinant proteins
<i>Rhodococcus opacus</i>	DSM44193	PD630	German Collection of Microorganisms and Cell Cultures	Host strain to express recombinant proteins
<i>Streptomyces coelicolor</i>	JCM4979	A3 (2)	Japan Collection of Microorganisms	Source of <i>TidA</i> Source of <i>Tufp</i>
<i>Streptomyces azureus</i>	JCM4217	ATCC14921	Japan Collection of Microorganisms	Source of <i>Thio'</i>
<i>Escherichia coli</i>	TOP10		Invitrogen	Host strain to express recombinant proteins
<i>Escherichia coli</i>	DH5α			General cloning

【0160】

【発明の効果】

実施例 1 3 から 1 8 並びに実施例 2 0 に示されるように、本発明の発現ベクターを用いることにより、4℃という低温条件下で外来遺伝子のコードするタンパク質を発現産生させることが可能である。

【 0 1 6 1 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Advanced Industrial Science and Technology

<120>

<130> 331H01018

<140>

<141>

<160> 113

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN1

<400> 1

cagagctcgt caggtggcac ttttc

25

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN2

<400> 2

gttgtagaac tagtcgtgcc agctgcatta

30

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN120

<400> 3

gctgtacacc cgagaagctc ccagcg

26

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN121

<400> 4

cggagctctt gaacgagagt tggccgttg

29

<210> 5

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN122

<400> 5

tcagatctat cgtcatcgac tgcgatcacg ttgacgccg

39

<210> 6

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN123

<400> 6

acggatcctc cgctgaaatc tcgccgtgcc t

31

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN130

<400> 7

cttcatatgc ggagctcgac cgcgcggg

28

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN131

<400> 8

atcgagtcgt tcaagggcgt cggc

24

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer NEB1233

<400> 9

agcggataac aatttcacac agg

23

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN10

<400> 10

caccaggatg atccccgac

19

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN11

<400> 11

gacagtgaca tcaccagc

18

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer NEB1224

<400> 12

cgccagggtt ttcccagtca cgac

24

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN40

<400> 13

atgagctact ccgtgggaca ggtg

24

<210> 14

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN41

<400> 14

tgcagatctt ccgtttcgac gtgacggag

29

<210> 15

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN42

<400> 15

cagtctagaa ttgatctcct cgaccg

26

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN43

<400> 16

tgcaagctcc tatgtaaacg

20

<210> 17

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN55

<400> 17

cgcctgctcc acggccgcc

19

<210> 18

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN56

<400> 18

atggaggcac gcagcatg

18

<210> 19

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN57

<400> 19

cgccccctcg gagtcggcg

19

<210> 20

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN58

<400> 20

atggacgccg ccgaggac

18

<210> 21

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN147

<400> 21

cgtgtacata tcgaggcggg ctccca

26

<210> 22

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN39

<400> 22

atccatggcc gctcccttct ctgacgccgt c

31

<210> 23

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN36

<400> 23

accatggatc aggaatgcat ag

22

<210> 24

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN37

<400> 24

ttactagttt attaatgatg atgatgatga tgcaggtggt tcaggatgaa atccgaaag 59

<210> 25

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN6

<400> 25

cgtctagagt cccgctgagg cggcgtagc

29

<210> 26

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN9

<400> 26

ctactagtcg acccaccggc acccgtgag

29

<210> 27

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN141

<400> 27

aatctagagt aacgggctac tccgtttaac

30

<210> 28

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN142

<400> 28

gggtcgacgg tcctcctgtg gagtggttct

30

<210> 29

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN145

<400> 29

gcactcgaga tgaaatctaa caatgcgctc atc

33

<210> 30

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN152

<400> 30

agactagtcc tcaacgacag gagcacgatc

30

<210> 31

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer T7

<400> 31

gtaatacgac tcactatagg gc

22

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN153

<400> 32

aatccacagg acgggtgtgg

20

<210> 33

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN154

<400> 33

ctctacgccg gacgcatcg

19

<210> 34

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer T3

<400> 34

gcaattaacc ctactaaag gg

22

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN155

<400> 35

acgacgctct cccttatgcg

20

<210> 36

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN156

<400> 36

ccgatgccct tgagagcct

19

<210> 37

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN110

<400> 37

aaccatggta tatctccttc ttaaagttaa acaaaattat ttctagacgc cgtccacgct 60
gcctcct 67

<210> 38

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer NNco1

<400> 38

catgggccac catcaccatc accatatggg aattctacgt agcggccgcg gatccaagct 60
tagatctcga ggatgaa 77

<210> 39

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer NNco2

<400> 39

ctagttcatc ctcgagatct aagcttggat ccgcggccgc tacgtagaat tcccatatgg 60
tgatggtgat ggtggcc 77

<210> 40

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer CNcol

<400> 40

catgggaatt ctacgtagcg gccgcggatc caagcttaga tctcgaggac atcaccatca 60
ccatcactga a 71

<210> 41

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer CNco2

<400> 41

ctagttcagt gatggtgatg gtgatgtcct cgagatctaa gcttggatcc gcggccgcta 60
cgtagaattc c 71

<210> 42

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN159

<400> 42

tccatatgcg ctcccttctc tgacgccgt

29

<210> 43

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer NNdel

<400> 43

tatgggcat caccatcacc atcacgcat gggaattcta cgtagcggcc gcggatccaa 60

gcttagatct cgaggatgaa

80

<210> 44

<211> 82

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer NNde2

<400> 44

ctagttcatc ctcgagatct aagcttggat ccgcggccgc tacgtagaat tcccatggcg 60
tgatggtgat ggtgatggcc ca 82

<210> 45

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer CNde1

<400> 45

tatgggaatt ctacgtagcg gccgcggatc caagcttaga tctcgaggac atcaccatca 60
ccatcactga a 71

<210> 46

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer CNde2

<400> 46

ctagttcagt gatggtgatg gtgatgtcct cgagatctaa gcttggatcc gcggccgcta 60
cgtagaattc cca 73

<210> 47

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN160

<400> 47

aacatatgta tatctccttc ttaaagttaa ac

32

<210> 48

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN97

<400> 48

ataccatgga acctcatgaa gc

22

<210> 49

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN98

<400> 49

aactcgagat cccataagtg ctttcattctt

30

<210> 50

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN82

<400> 50

tactcatgat gcaccacat caccatc

27

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer
pTrc99A-Cseq

<400> 51

cagaccgctt ctgcgttctg

20

<210> 52

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN272

<400> 52

atccatggcc cctatactag gttattg

27

<210> 53

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN271

<400> 53

aactcgagtc aatccgattt tggaggatgg tcg

33

<210> 54

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN150

<400> 54

catgggaatt cagatctctc gaga

24

<210> 55

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN212

<400> 55

agcttctcga gagatctgaa ttcc

24

<210> 56

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer
pBAD(Forward)

<400> 56

ctatgccata gcatttttat cc

22

<210> 57

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN166

<400> 57

gccatatggg gtttttttca ttgttcacg

30

<210> 58

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN167

<400> 58

aactcgagtc agtatttgtc aggcagtc

29

<210> 59

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN168

<400> 59

gcctcgaggg gtttttttca ttgtttcacg

30

<210> 60

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN169

<400> 60

gaggtacctc agtatttgtc aggcagtc

29

<210> 61

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN170

<400> 61

cacatatgct ccgccagatc ctcgg

25

<210> 62

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN171

<400> 62

ttgaattcctt agaagtctgg gccttctttc

30

<210> 63

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN172

<400> 63

ccctcgagat gctccgccag atcctcgg

28

<210> 64

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN177

<400> 64

cccatatggc cgggcagtca gacaag

26

<210> 65

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN178

<400> 65

gagaattctc aatcttctgc catgtagagg

30

<210> 66

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN179

<400> 66

aactcgagat ggccgggcag tcagacaag

29

<210> 67

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN290

<400> 67

aacatatgaa caagagctct gaagatatcc

30

<210> 68

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN262

<400> 68

atgaattcat ggcaaccatc taactg

26

<210> 69

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN261

<400> 69

ttctcgagaa caagagctct gaagatatcc g

31

<210> 70

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN295

<400> 70

aacatatggc tgtccctgac aaaacggtc

29

<210> 71

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN266

<400> 71

ctaagctttt aatgtttgtg gaaagtgc

28

<210> 72

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN265

<400> 72

gtctcgaggt ccctgacaaa acggtcaaat g

31

<210> 73

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN288

<400> 73

ttccatggca cggaagagcc tctggg

26

<210> 74

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primersHN268

<400> 74

ttgaattcca gacaatgagc tggaggg

27

<210> 75

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN267

<400> 75

aactcgagcg gaagagcctc tgggactac

29

<210> 76

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN243

<400> 76

ctccatgggg attatcagaa tccctctgcg c

31

<210> 77

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN244

<400> 77

agctcgagag agtacgacag cattggcaaa gcc

33

<210> 78

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN245

<400> 78

aaccatgggc accaccgatg cggagttcca cacc

34

<210> 79

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN246

<400> 79

aactcgagat ccaaattgat caatgacttt ctgtatccac

40

<210> 80

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN247

<400> 80

aaccatggga attgttggag gatttaactg tgag

34

<210> 81

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN248

<400> 81

aactcgagag tcattttcag ccatagtttc tcttatcc

38

<210> 82

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN275

<400> 82

aacatatgct gaggctctgc tccttcaatg tgagg

35

<210> 83

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN307

<400> 83

ttctcgagcg tgatacctag gagcg

25

<210> 84

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN277

<400> 84

ggccatgggg acaccagaaa tctcatgc

28

<210> 85

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN278

<400> 85

aagaattcac cgagtttact tacagaaccc

30

<210> 86

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN279R

<400> 86

aaccatgggc aaaggagatc ctaagaag

28

<210> 87

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN280

<400> 87

ttgaattcct gcgctagaac caacttattc atc

33

<210> 88

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN314

<400> 88

aactcgaggg caaaggagat cctaagaag

29

<210> 89

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN283

<400> 89

gaccatggct cctgagcaat gggaag

26

<210> 90

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN284

<400> 90

ataagctttt aagggtcctc atccacgtga a

31

<210> 91

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN164

<400> 91

aacatatgga cgggtccggg gagcag

26

<210> 92

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN194

<400> 92

aagaattctc agcccatctt cttccagatg

30

<210> 93

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN193

<400> 93

aactcgagat ggacgggtcc ggggagca

28

<210> 94

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN305

<400> 94

ctcatatggc tgtggatact acaagg

26

<210> 95

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN306

<400> 95

atctcgagga ttctactggc ccagcatgc

29

<210> 96

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN296

<400> 96

aactcgagcg tcggtatcct ttttgcgctg

30

<210> 97

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN330

<400> 97

acccatgggc gacgggtgctg gaaattg

27

<210> 98

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN259

<400> 98

aactcgagat gaagcttgta aatggcagaa ag

32

<210> 99

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN260

<400> 99

aagaattcct ctactgtgta tcggtcat

28

<210> 100

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN269

<400> 100

aactcgagct gcaaggcttg gagagtgatg

30

<210> 101

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN270

<400> 101

gaggtacctt tcagtttagc ttgtcgaaat ac

32

<210> 102

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN263

<400> 102

gcctcgagct tcctgagaag accatacgat g

31

<210> 103

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN264

<400> 103

ctgaattctg tttaatatatt atgaaatgtg

30

<210> 104

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN343

<400> 104

aaactagttc agtgatggtg atggtgatgc tcgagagatc t

41

<210> 105

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer T7 Universal

<400> 105

taatacgact cactataggg

20

<210> 106

<211> 8166

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pTip·NH1

<400> 106

gagctcgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60
cttccccttg cgttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120

tcacacccca ggaatcgct cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180
ggacaccatc gcaaatccgt ccgatcccg ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagccccctca tgcacagcat 300
cgcgcccggt gtggagttca tcgaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420
caaccagttg ttcaaggggg agcggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480
cccggccagg ttcggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacggggt 540
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgcgtcg gagcgtcggg 600
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgccgac cggcgtctcc aaagggccag 660
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgctgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgcctt 720
cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 780
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc cttgctgttc ggcagcgaaa aggggtgggcc 840
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 900
cgagtctctc aacgtttccg ttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960
tctcgcgcc aaccgataag cgcctctgtt cctcgagcg tcggttctc gacctcgatt 1020
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080
gtggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac cccgttctca cgctttaggc ttgaccccg 1200
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaacc ggtggaatgc ccccggcacc cgggctttcc 1260
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa ccactccaca ggaggaccgt 1320
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcacc tggtatgctgt 1380
aggcataggc ttggttatgc cggctactgc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1440
cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgctatat gcgttgatgc aatttctatg 1500
cgacccggt ctcggagcac tgtccgaccg ctttggccgc cgcccagtc tgctcgcttc 1560
gctacttga gccactatcg actacgcgat catggcgacc acaccgtcc tgtggattct 1620
ctacgccgga cgcacgttg ccggcatcac cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgcccta 1680
tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg ggctcgccac ttcgggctca tgagcgcttg 1740
tttcggcgtg ggtatgggtg caggccccgt ggccggggga ctgttggcg ccatctcctt 1800
gcatgcacca ttccttgccg cggcggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1860

cctaatagcag gagtcgcata agggagagcg tcgtccgatg cccttgagag ccttcaaccc 1920
 agtcagctcc ttccggtggg cgcggggcat gactatcgtc gccgcactta tgactgtctt 1980
 ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040
 ccgctttcgc tggagcgca cgatgatcgg cctgtcgctt gcggtattcg gaatcttgca 2100
 cgccctcgct caagccttcg tcaactggctc cgccaccaa cgtttcggcg agaagcaggc 2160
 cattatcgcc ggcatggcgg ccgacgcgtt gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2220
 aggctggatg gccttcccca ttatgattct tctcgcttcc ggcgccatcg ggatgcccgc 2280
 gttgcaggcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgacat caggacagc ttcaaggatc 2340
 gctcgcggct cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgatcgta cggcgattta 2400
 tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgcgg ccctatacct 2460
 tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcggtgc atggagccgg gccacctga cctgaatgga 2520
 agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagccaa tcaattcttg 2580
 cggagaactg tgaatgcga aaccaaccct tggcagaaca tatccatcg gtccgccatc 2640
 tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcatg 2700
 atcgtgctcc tgtcgttag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2760
 gaatcatctg cgtttctcgc acgcaacgta ctigcaacgt tgcaactcct agtgttgtga 2820
 atcacacccc accgggggggt gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg cccaggaaga 2880
 tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggtggcc ggcttcgccg 2940
 gactgacggt gcgcacgctg caccactacg acgacatcgg cctgctcgta ccgagcgagc 3000
 gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgccgacct cgaccggctg cagcagatcc 3060
 tgttctaccg ggagctgggc ttcccgctcg acgaggtcgc cgccctgctc gacgacccgg 3120
 ccgcggaccc gcgcgcgcac ctgcgccgcc agcacgagct gctgtccgcc cggatcggga 3180
 aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3240
 acctacccc ggaggagaag ttcgaggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3300
 aggaggtccg ggaacgctgg gggaacaccg acgcctaccg ccagtccaag gagaagaccg 3360
 cctcgtacac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctacccggc 3420
 gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc ccgccgactc cgagggggcg atggacgccg 3480
 ccgaggacca ccggcagggc atcgcccga accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540
 cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgccgcca 3600

agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgccgtc cggcacaccc 3660
 cctgagcggg ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tctactcccg 3720
 gccacgacca cgcgcgtccc gtacgcgcac acctcggtgc ccacgtccgc cgcctccgtc 3780
 acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gtcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3840
 tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacatc aaatatgtat ccgctcatga 3900
 gacaataacc ctgataaatg ctcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960
 atttccgtgt cgcccttatt cccttttttg cggcatittg ccttcctgtt tttgctcacc 4020
 cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca 4080
 tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4140
 caatgatgag cactttttaa gttctgctat gtggcgcggg attatcccg attgacgccg 4200
 ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttgggt gagtactcac 4260
 cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 4320
 taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380
 agctaaccgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac 4440
 cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4500
 caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4560
 taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 4620
 ctggctgggt tattgtgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4680
 cagcactggg gccagatggg aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4740
 aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800
 attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 4860
 ttttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920
 aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980
 gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgtaccag 5040
 cgggtggtttg tttgccgat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5100
 gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagttagcc gtagttaggc caccattca 5160
 agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaatt cctgttacca gtggctgctg 5220
 ccagtggcga taagtcgtgt ctaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg 5280
 cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 5340

acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 5400
 gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc 5460
 ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5520
 agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580
 cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt 5640
 tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 5700
 gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgcccaatac 5760
 gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gactagagtc 5820
 ccgctgaggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcgttg tcaccaaccg ggggtggaacg 5880
 gcgccggtat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgttt gtgcaggttt 5940
 cgcgtgttgc agtccctcgc accggcacc gcagcgaggg gtcacgggt gccggtgggt 6000
 cgactagtgc atcctcgaga tctaagcttg gatccgcggc cgctacgtag aattcccata 6060
 tggatgatgt gatggtggcc catggccgct cccttctctg acgccgtcca cgctgcctcc 6120
 tcacgtgacg tgaggtgcaa gcccggacgt tccgcgtgcc acgccgtgag ccgccgcgtg 6180
 ccgtcggctc cctcagcccg ggcggccgtg ggagcccgcc tcgatatgta caccgagaa 6240
 gtcaccagcg tctctctggg ccgcgatact cgaccaccac gcacgcacac cgcactaacg 6300
 attcggccgg cgctcgattc ggccggcgct cgattcggcc ggcgctcgat tcggccggcg 6360
 ctcgattcgg ccggcgctcg attcggccga gcagaagagt gaacaaccac cgaccacgct 6420
 tccgctctgc gcgccgtacc cgacctact cccgcagctc gaagcagctc ccgggagtac 6480
 cgccgtactc accgcctgt gtcaccatc caccgacgca aagcccaacc cgagcacacc 6540
 tcttgacca aggtgccgac cgtggctttc cgctcgcagg gttccagaag aaatcgaacg 6600
 atccagcgcg gcaaggttca aaaagcaggg gttggtgggg aggaggtttt ggggggtgtc 6660
 gccgggatac ctgatatggc tttgttttgc gtagtcgaat aattttccat atagcctcgg 6720
 cgcgtcggac tcgaatagtt gatgtggcg ggcacagttg ccccatgaaa tccgcaacgg 6780
 ggggcgtgct gagcgatcgg caatggcgcg atgcggtgtt gcttccgcac cggccgttcg 6840
 cgacgaacaa cctccaacga ggtcagtacc ggatgagccg cgacgacgca ttggcaatgc 6900
 ggtacgtcga gcattcaccg cagcgttgc tcggatctat cgtcatcgac tgcgatcacg 6960
 ttgacgccgc gatgcgcgca ttcgagcaac catccgacca tccggcgccg aactgggtcg 7020
 cacaatcgcc gtccggccgc gcacacatcg gatggtggct cggccccaac cacgtgtgcc 7080

gcaccgacag cgcccgactg acgccactgc gctacgcca ccgcatcgaa accggcctca 7140
agatcagcgt cggcggcgat ttgcggtatg gcgggcaact gacaaaaaac ccgattcacc 7200
ccgattggga gacgatctac ggcccggcca ccccgtagac attgcggcag ctggccacca 7260
tccacacacc ccggcagatg ccgcgtcggc ccgatcgggc cgtgggcctg ggccgcaacg 7320
tcaccatgtt cgacgccacc cggcgatggg catacccga gtggtggcaa caccgaaacg 7380
gaaccggccg cgactgggac catctcgtcc tgcagcactg ccacgccgtc aacaccgagt 7440
tcacgacacc actgccgttc accgaagtac gcgccaccgc gcaatccatc tccaaatgga 7500
tctggcgcaa tttcaccgaa gaacagtacc gagcccgaca agcgcatctc ggtcaaaaag 7560
gcggcaaggc aacgacactc gccaaacaag aagccgtccg aaacaatgca agaaagtacg 7620
acgaacatac gatgcgagag gcgattatct gatgggcgga gccaaaaatc cgggtgcgccg 7680
aaagatgacg gcagcagcag cagccgaaaa attcggtgcc tccactcgca caatccaacg 7740
cttgtttgct gagccgcgtg acgattacct cggccgtgcg aaagctcgcc gtgacaaagc 7800
tgtcgagctg cggaagcagg ggttgaagta ccgggaaatc gccgaagcga tggaactctc 7860
gaccgggata gtcggccgat tactgcacga cggccgcagg cacggcgaga tttcagcgga 7920
ggatctgtcg gcgtaaccaa gtcagcgggt tgtcgggttc cggccggcgc tcggcactcg 7980
gaccggccgg cggatggtgt tctgcctctg gcgcagcgtc agctaccgcc gaaggcctgt 8040
catcgaccgg cttcgactga agtatgagca acgtcacagc ctgtgattgg atgatccgct 8100
cacgctcgac cgctacctgt tcagctgccg cccgctgggc atgagcaacg gccaaactctc 8160
gttcaa 8166

<210> 107

<211> 8169

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pTip·NH2

<400> 107

gagctcgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60
cttcccccttg cgttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtagggtg 120
tcacacccca ggaatcgct cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180
ggacaccatc gcaaatccgt ccgatccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagccccca tgcacagcat 300
cgcgcccggtg gtggagtcca tcgaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420
caaccagttg ttcaaggggg agcgggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480
cccggccagg ttccggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacggggg 540
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgctcg gagcgctcggg 600
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcgac cggcgtctcc aaaggccag 660
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgctgt tctctccggt cgcgaggagg ccacgcctt 720
cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 780
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc cttgctgttc ggcagcgaaa aggggtgggccc 840
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 900
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960
tctcgggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggacgc tcggttcctc gacctcgatt 1020
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatcagag gtcaacggtc 1080
gtgggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac cccgtttctca cgctttaggc ttgaccccgg 1200
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaacc ggtggaatgc cccggcacc cgggctttcc 1260
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa cactccaca ggaggaccgt 1320
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcacc tggatgctgt 1380
aggcataggc ttggttatgc cggctactgc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1440
cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgtatat gcgttgatgc aatttctatg 1500
cgcacccgtt ctcgagcac tgtccgaccg ctttgccgc cgcccagtc tgctcgcttc 1560
gctacttggg gccactatcg actacgcgat catggcgacc acaccgtcc tgtggattct 1620
ctacgccgga cgcatcgtgg ccggcatcac cggcgccaca ggtgcggtg ctggcgcccta 1680

tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg ggctcgccac ttcgggctca tgagcgcttg 1740
 tticggcgtg ggtatggtgg caggccccgt ggccggggga ctgttgggcg ccatctcctt 1800
 gcatgcacca ttccttgcg cggcgggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1860
 cctaatagcag gagtcgcata agggagagcg tcgtccgatg cccttgagag ccttcaaccc 1920
 agtcagctcc ttccggtggg cgcggggcat gactatcgtc gccgcactta tgactgtctt 1980
 ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040
 ccgctttcgc tggagcgcg ccatgatcg cctgtcgctt gcggtattcg gaatcttgca 2100
 cgccctcgct caagccttcg tcaactggctc cgccacaaaa cgtttcggcg agaagcaggc 2160
 cattatcgcc ggcatggcgg ccgacgcgct gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2220
 aggctggatg gccttcccca ttatgattct tctcgcttcc ggcggcatcg ggatgcccgc 2280
 gttgcaggcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgacat caggacagc ttcaaggatc 2340
 gctcgcggct cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgatcgta cggcgattta 2400
 tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgccg ccctatacct 2460
 tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcggtgc atggagccgg gccacctcga cctgaatgga 2520
 agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagccaa tcaattcttg 2580
 cggagaactg tgaatgcgca aaccaacct tggcagaaca tatccatcgc gtccgccatc 2640
 tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcggtgggt cctggccacg ggtgcgcatg 2700
 atcgtgctcc tgtcgttgag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2760
 gaatcatctg cgtttctcgc acgcaacgta cttgcaacgt tgcaactcct agtgttgtga 2820
 atcacacccc accggggggg gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg cccaggaaga 2880
 tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggtggcc ggcttcgccg 2940
 gagtgacggt gcgcacgctg caccactacg acgacatcgg cctgctcgta ccgagcgagc 3000
 gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgccgacct cgaccggctg cagcagatcc 3060
 tgttctaccg ggagctgggc ttcccgctcg acgaggtcgc cgccctgctc gacgaccggg 3120
 ccgcggaacc gcgcgcgcac ctgcgccgcc agcacgagct gctgtccgcc cggatcggga 3180
 aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3240
 acctacccc ggaggagaag ttcgaggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3300
 aggaggtccg ggaacgctgg gggaacaccg acgcctaccg ccagtccaag gagaagaccg 3360
 cctcgtacac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctacccggc 3420

gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc ccgccgactc cgagggggcg atggacgccg 3480
 ccgaggacca ccggcagggc atcgcccga accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540
 cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgccgcca 3600
 agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgccgtc cggcacaccc 3660
 cctgagcggg ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tcactcccgg 3720
 gccacgacca ccgccgtccc gtacgcgcac acctcggtgc ccacgtccgc cgcctccgtc 3780
 acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3840
 tgcgcggaac ccctatttgt ttatTTTTt aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga 3900
 gacaataacc ctgataaatg cttaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960
 atttccgtgt cgcccttatt ccTTTTttg cggcattttg ctttctgtt tttgctcacc 4020
 cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca 4080
 tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4140
 caatgatgag cacttttaaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccggt attgacgccg 4200
 ggcaagagca actcggctgc cgcatacact atttctcagaa tgacttggtt gagtactcac 4260
 cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 4320
 taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380
 agctaaccgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac 4440
 cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4500
 caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4560
 taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 4620
 ctggctgggt tattgctgat aaatctggag ccgggtgagc tgggtctcgc ggtatcattg 4680
 cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4740
 aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800
 attggttaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 4860
 ttttaattta aaggatctag gtgaagatcc ttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920
 aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980
 gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag 5040
 cgggtggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5100
 gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagtgtagcc gtagttaggc caccattca 5160

agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg 5220
ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatatgta ccggataagg 5280
cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 5340
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 5400
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc 5460
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5520
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580
cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt 5640
tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgccttga gtgagctgat accgctcgcc 5700
gcagccgaac gaccgagcgc agcagtcag tgagcgagga agcggaagag cgcccaatac 5760
gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gactagagtc 5820
ccgctgaggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcgggtg tcaccaaccg ggggtggaacg 5880
gcgccggtat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgttt gtgcaggttt 5940
cgcgtgttgc agtccctcgc accggcaccc gcagcgaggg gctcacgggt gccggtgggt 6000
cgactagtgc atcctcgaga tctaagcttg gatccgcggc cgctacgtag aattcccatg 6060
gcgtgatggt gatggtgatg gcccatatgc gctcccttct ctgacgccgt ccacgctgcc 6120
tcctcacgtg acgtgaggtg caagcccgga cgttccgct gccacgccgt gagccgccgc 6180
gtgccgtcgg ctccctcagc ccgggcggcc gtgggagccc gcctcgatat gtacaccgca 6240
gaagctccca gcgtcctcct gggccgcgat actcgaccac cacgcacgca caccgcacta 6300
acgattcggc cggcgctcga ttcggccggc gctcgattcg gccggcgctc gattcggccg 6360
gcgctcgatt cggccggcgc tcgattcggc cgagcagaag agtgaacaac caccgaccac 6420
gcttccgctc tgcgcgccgt acccgacct cctcccgcag ctgaaagcag ctcccgggag 6480
taccgccgta ctcaccgcc tgtgtctacc atccaccgac gcaaagccca acccgagcac 6540
acctcttgca ccaaggtgcc gaccgtggct ttccgctcgc agggttccag aagaaatcga 6600
acgatccagc gcggcaaggt tcaaaaagca ggggttggtg gggaggaggt tttggggggg 6660
gtcgccggga tacctgatat ggctttgttt tgcgtagtcg aataatttt catatagcct 6720
cggcgcgctg gactcgaata gttgatgtgg gcgggcacag ttgccccatg aaatccgcaa 6780
cggggggcgt gctgagcgat cggcaatggg cggatgcggt gttgcttccg caccggccgt 6840
tcgcgacgaa caacctcaa cgaggtcagt accggatgag ccgcgacgac gcattggcaa 6900

tgcggtacgt cgagcattca ccgcacgcgt tgctcggatc tatcgtcatc gactgcgac 6960
acgttgacgc cgcgatgcgc gcattcgagc aaccatccga ccatccggcg ccgaactggg 7020
tcgcacaatc gccgtccggc cgcgcacaca tcggatgggtg gctcggcccc aaccacgtgt 7080
gccgcaccga cagcgcgccga ctgacgccac tgcgctacgc ccaccgcac gaaaccggcc 7140
tcaagatcag cgtcggcggc gatttcgcgt atggcgggca actgaccaa aacccgattc 7200
accccgattg ggagacgac tacggcccg ccaccccgta cacattgcgg cagctggcca 7260
ccatccacac accccggcag atgccgcgtc ggcccgatcg ggccgtgggc ctgggccgca 7320
acgtcaccat gttcgacgcc acccggcgat gggcataccc gcagtgggtg caacaccgaa 7380
acggaaccgg ccgcgactgg gaccatctcg tcctgcagca ctgccacgcc gtcaacaccg 7440
agttcacgac accactgccg ttcaccgaag tacgcgccac cgcgcaatcc atctccaaat 7500
ggatctggcg caatttcacc gaagaacagt accgagcccg acaagcgcat ctcggtcaaa 7560
aaggcggcaa ggcaacgaca ctgcgcaaac aagaagccgt ccgaaacaat gcaagaaagt 7620
acgacgaaca tacgatgcga gaggcgatta tctgatgggc ggagccaaaa atccggtgcg 7680
ccgaaagatg acggcagcag cagcagccga aaaattcggg gcctccactc gcacaatcca 7740
acgcttggtt gctgagccgc gtgacgatta cctcggccgt gcgaaagctc gccgtgacaa 7800
agctgtcgag ctgcggaagc aggggttgaa gtaccgggaa atcgccgaag cgatggaact 7860
ctcgaccggg atcgtcggcc gattactgca cgacccccgc aggcacggcg agatttcagc 7920
ggaggatctg tcggcgtaac caagtcagcg ggttgtcggg ttccggccgg cgctcggcac 7980
tcggaccggc cggcggatgg tggttctgcct ctggcgcagc gtcagctacc gccgaaggcc 8040
tgtcatcgac cggcttcgac tgaagtatga gcaacgtcac agcctgtgat tggatgatcc 8100
gctcacgctc gaccgctacc tggtcagctg ccgcccgtg ggcatgagca acggccaact 8160
ctcgttcaa 8169

<210> 108

<211> 8160

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pTip·CH1

<400> 108

gagctcgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60
cttcccccttg cgttggatgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120
tcacacccca ggaatcgct cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180
ggacaccatc gcaaatccgt ccgatcccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagccccctca tgcacagcat 300
cgcggccggg gtggagtcca tcgaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420
caaccagttg ttcaaggggg agcgggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480
cccggccagg ttccggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacgggggt 540
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgcgtcg gagcgtcggg 600
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgccgac cggcgtctcc aaagggccag 660
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgtcgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgctt 720
cattcgggac agcgggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 780
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc cttgctgttc ggcagcgaaa aggggtgggccc 840
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 900
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960
tctcgcggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggacgc tcggttcctc gacctcgatt 1020
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080
gtgggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac cccgttctca cgctttaggc ttgacccccg 1200
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaaccc ggtggaatgc ccccggcacc cgggctttcc 1260
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa cactccaca ggaggaccgt 1320
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcacc tggatgctgt 1380
aggcataggc ttggttatgc cggactgcc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1440
cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgctatat gcgttgatgc aatttctatg 1500

cgcacccgtt ctcggagcac tgtccgaccg ctttggccgc cgcccagtcc tgctcgcttc 1560
gctacttgga gccactatcg actacgcgat catggcgacc acaccgtcc tgttgattct 1620
ctacgccgga cgcatcgtgg ccggcatcac cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgccta 1680
tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg ggctcgccac ttcgggctca tgagcgcttg 1740
tttcggcgtg ggtatgggtg caggccccgt ggccggggga ctgttgggcg ccatctcctt 1800
gcatgcacca ttccttgcg cggcggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1860
cctaatagcag gatcgcata agggagagcg tcgtccgatg cccttgagag cttcaaccc 1920
agtcagctcc ttccggtggg cgcggggcat gactatcgtc gccgactta tgactgtctt 1980
ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040
ccgctttcgc tggagcgga cgatgatcgg cctgtcgctt gcggtattcg gaatcttgca 2100
cgccctcgct caagccttcg tcttggtcc cgccacaaa cgtttcggcg agaagcaggc 2160
cattatcgcc ggcattggcg ccgacgcgt gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2220
aggctggatg gccttcccca ttatgattct tctcgcttcc ggccggcatcg gcatgccccg 2280
gttgcaggcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgacat caggacagc ttcaaggatc 2340
gctcgcggct cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgatcgtca cggcgattta 2400
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgccg ccctatacct 2460
tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcggtgc atggagccgg gccacctga cctgaatgga 2520
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagcaa tcaattcttg 2580
cggagaactg tgaatgcga aaccaacct tggcagaaca tatccatcg gtccgccatc 2640
tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcatg 2700
atcgtgtcc tgctgttag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2760
gaatcatctg cgtttctcg acgcaacgta cttgcaacgt tgcaactcct agtgttgtga 2820
atcacacccc accgggggggt gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg ccaggaaga 2880
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggtggcc ggcttcgccg 2940
gagtgcggt gcgcacgtg caccactacg acgacatcgg cctgctcgta ccgagcgagc 3000
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgccgacct cgaccggctg cagcagatcc 3060
tgttctaccg ggagctgggc ttcccgtcg acgaggtcgc cgccctgctc gacgaccgg 3120
ccgcggaccc gcgcgcgcac ctgcgccgc agcacgagct gctgtccgcc cggatcggga 3180
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3240

acctcacccc ggaggagaag ttcgaggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3300
aggaggtccg ggaacgctgg gggaacaccg acgcctaccg ccagtccaag gagaagaccg 3360
cctcgtacac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctcacccggc 3420
gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc ccgccgactc cgagggggcg atggacgccg 3480
ccgaggacca ccggcagggc atcgcccgca accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgccgcca 3600
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgccgtc cggcacaccc 3660
cctgagcggg ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tctctcccgg 3720
gccacgacca ccgccgtccc gtacgcgcac acctcggtgc ccacgtccgc cgcctccgtc 3780
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3840
tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga 3900
gacaataacc ctgataaatg ctcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960
atttccgtgt cgcccttatt cccttttttg cggcattttg ccttcctgtt tttgctcacc 4020
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca 4080
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4140
caatgatgag cactttttaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg 4200
ggcaagagca actcggctgc cgcatacact attctcagaa tgacttgggt gagtactcac 4260
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 4320
taaccatgag tgataaacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380
agctaaccgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac 4440
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4500
caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4560
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 4620
ctggctgggt tattgtgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4680
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4740
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 4860
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980

gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag 5040
cggtgggttg tttgccgat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5100
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagttagcc gtagttaggc caccacttca 5160
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg 5220
ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg 5280
cgcagcggtc gggctgaacg ggggggttctg gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 5340
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 5400
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgaggagc 5460
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5520
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580
cggccttttt acggttcttg gccttttctg ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt 5640
tatccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 5700
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgcccaatac 5760
gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gactagagtc 5820
ccgctgaggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcgggtg tcaccaaccg ggggtggaacg 5880
gcgccggtat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgttt gtgcaggttt 5940
cgcgtgttg agtcctcgc accggcacc gcagcgaggg gctcacgggt gccggtgggt 6000
cgactagttc agtgatggtg atggtgatgt cctcgagatc taagcttgga tccgcggccg 6060
ctacgtagaa ttcccatggc cgctcccttc tctgacgccg tccacgctgc ctctcacgt 6120
gacgtgaggt gcaagcccgg acgttccgcg tgccacgccg tgagccgccg cgtgccgtcg 6180
gctccctcag cccgggcggc cgtgggagcc cgcctcgata tgtacaccgc agaagctccc 6240
agcgtcctcc tgggccgcga tactcgacca ccacgcacgc acaccgact aacgattcgg 6300
ccggcgctcg attcggccgg cgctcgattc ggccggcgct cgattcggcc ggcgctcgat 6360
tcggccggcg ctcgattcgg ccgagcagaa gagtgaacaa ccaccgacca cgcttccgct 6420
ctgcgcgccg taccgacct acctcccgca gctcgaagca gctcccggga gtaccgccgt 6480
actacccgc ctgtgctcac catccaccga cgcaaagccc aaccgagca cacctcttgc 6540
accaaggtgc cgaccgtggc tttccgctcg cagggttcca gaagaaatcg aacgatccag 6600
cgcggcaagg ttcaaaaagc aggggttggt ggggaggagg ttttgggggg tgtcgccggg 6660
atacctgata tggctttgtt ttgcgtagtc gaataatttt ccatatagcc tcggcgcgctc 6720

ggactcgaat agttgatgtg ggcgggcaca gttgccccat gaaatccgca acggggggcg 6780
tgctgagcga tcggcaatgg gcggatgcgg tgttgcttcc gcaccggccg ttcgcgacga 6840
acaacctcca acgaggtcag taccggatga gccgcgacga cgcattggca atgcggtacg 6900
tcgagcattc accgcacgcg ttgctcggat ctatcgtcat cgactgcgat cacgttgacg 6960
ccgcgatgcg cgcattcgag caaccatccg accatccggc gccgaactgg gtcgcacaat 7020
cgccgtccgg ccgcgcacac atcggatggt ggctcggccc caaccacgtg tgccgcaccg 7080
acagcggccc actgacgcca ctgcgctacg cccaccgcat cgaaaccggc ctcaagatca 7140
gcgtcggcgg cgatttcgcg tatggcgggc aactgaccaa aaaccgatt caccgccatt 7200
gggagacgat ctacggcccc gccaccccggt acacattgcg gcagctggcc accatccaca 7260
caccgccgca gatgccgct cgccccgatc gggccgtggg cctgggccgc aacgtcacca 7320
tgttcgacgc caccggcgga tgggcatacc cgcagtgggt gcaacaccga aacggaaccg 7380
gccgcgactg ggaccatctc gtcctgcagc actgccacgc cgtcaacacc gagttcacga 7440
caccactgcc gttcaccgaa gtacgcgcca ccgcgcaatc catctccaaa tggatctggc 7500
gcaatttcac cgaagaacag taccgagccc gacaagcgca tctcgggtcaa aaaggcggca 7560
aggcaacgac actcgccaaa caagaagccg tccgaaacaa tgcaagaaag tacgacgaac 7620
atacgatgcg agaggcgatt atctgatggg cggagccaaa aatccggtgc gccgaaagat 7680
gacggcagca gcagcagccg aaaaattcgg tgcctccact cgcacaatcc aacgcttggt 7740
tgctgagccg cgtgacgatt acctcggccg tgcgaaagct cgccgtgaca aagctgtcga 7800
gctgcggaag caggggttga agtaccggga aatcgccgaa gcgatggaac tctcgaccgg 7860
gatcgtcggc cgattactgc acgacgccc caggcacggc gagatttcag cggaggatct 7920
gtcggcgtaa ccaagtcagc gggttgtcgg gttccggccg gcgctcggca ctcggaccgg 7980
ccggcggatg gtgttctgcc tctggcgcag cgtcagctac cgccgaaggc ctgtcatcga 8040
ccggcttcga ctgaagtatg agcaacgtca cagcctgtga ttggatgatc cgctcacgct 8100
cgaccgctac ctgttcagct gccgcccgt gggcatgagc aacggccaac tctcgttcaa 8160

<210> 109

<211> 8160

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pTip·CH2

<400> 109

gagctcgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60
cttccccttg cgttggatgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120
tcacacccca ggaatcgct cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180
ggacaccatc gcaaatccgt ccgatccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagcccctca tgcacagcat 300
cgcggccggg gtggagttca tcgaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420
caaccagttg ttcaaggggg agcgggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480
cccggccagg ttcggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacgggggt 540
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgctcg gagcgtcggg 600
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcgac cggcgtctcc aaagggccag 660
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgtcgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgctt 720
cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tticcgtgaa 780
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc cttgctgttc ggcagcgaaa aggggtgggcc 840
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 900
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960
tctcgcgcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggacgc tcggttcctc gacctcgatt 1020
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080
gtgggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac cccgtttctca cgctttaggc ttgaccccgg 1200
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaaccc ggtggaatgc ccccggcacc cgggctttcc 1260
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa cactccaca ggaggaccgt 1320
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcacc tggatgctgt 1380

aggcataggc ttggttatgc cggctactgcc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1440
cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgctatat gcgttgatgc aatttctatg 1500
cgcacccgtt ctcggagcac tgtccgaccg ctttggccgc cgcccagtcc tgctcgcttc 1560
gctacttgga gccactatcg actacgcgat catggcgacc acaccgtcc tgtggattct 1620
ctacgccgga cgcatcgtgg ccggcatcac cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgcccta 1680
tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg ggctcgccac ttcgggctca tgagcgcttg 1740
tttcggcgtg ggtatgggtg caggccccgt ggccggggga ctgttggcg ccatctcctt 1800
gcatgcacca ttccttgccg cggcggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1860
cctaatagcag gagtgcata agggagagcg tcgtccgatg cccttgagag ccttcaacct 1920
agtcagctcc ttccggtggg cgcggggcat gactatcgtc gccgcactta tgactgtctt 1980
ctttatcatg caactcgtag gacagggtcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040
ccgctttcgc tggagcgca cgatgatcgg cctgtcgctt gcggtattcg gaatcttgca 2100
cgccctcgct caagccttcg tcttggtcc cgccacaaa cgtttcggcg agaagcaggc 2160
cattatcgcc ggcatggcgg ccgacgcgtt gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2220
aggctggatg gccttcccca ttatgattct tctcgcttcc ggcggcatcg ggatgcccgc 2280
gttgcaggcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgacat caggacagc ttcaaggatc 2340
gctcgcggtt cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgatcgtca cggcgattta 2400
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgccg ccctatactt 2460
tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcggtgc atggagccgg gccacctcga cctgaatgga 2520
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagccaa tcaattcttg 2580
cggagaactg tgaatgcga aaccaacct tggcagaaca tatccatcg gtccgccatc 2640
tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcatg 2700
atcgtgctcc tgtcgttgag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2760
gaatcatctg cgtttctcgc acgcaacgta cttgcaacgt tgcaactcct agtgttgga 2820
atcacacccc accggggggt gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg ccaggaaga 2880
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acagggtggc ggcttcgccg 2940
gagtgcggt gcgcacgctg caccactacg acgacatcgg cctgctcgta ccgagcgagc 3000
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgccgacct cgaccggctg cagcagatcc 3060
tgttctaccg ggagctgggc ttcccgtcg acgaggtcgc cgccctgctc gacgaccgg 3120

ccgcggaccc gcgcgcgcac ctgcgccgcc agcacgagct gctgtccgcc cggatcggga 3180
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3240
acctcacccc ggaggagaag ttcgaggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3300
aggaggtccg ggaacgctgg gggaacaccg acgcctaccg ccagtccaag gagaagaccg 3360
cctcgtacac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctcacccggc 3420
gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc ccgccgactc cgagggggcg atggacgccg 3480
ccgaggacca ccggcagggc atcgcccgca accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgccgcca 3600
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgccgtc cggcacaccc 3660
cctgagcggg ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tcaactcccgg 3720
gccacgacca ccgccgtccc gtacgcgcac acctcgggtc ccacgtccgc cgcctccgtc 3780
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3840
tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga 3900
gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960
atttccgtgt cgcccttatt cctttttttg cggcattttg ccttctgtt tttgctcacc 4020
cagaaaacgt ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca 4080
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4140
caatgatgag cacttttaaa gttctgctat gtggcgcggg attatcccgt attgacgccg 4200
ggcaagagca actcggctgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac 4260
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 4320
taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380
agctaaccgc ttttttgcac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac 4440
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4500
caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4560
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 4620
ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4680
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4740
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaatttcatt 4860

tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980
gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag 5040
cggtggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5100
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca 5160
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg 5220
ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg 5280
cgcagcggtc gggctgaacg ggggggttcgt gcacacagcc cagcttgag cgaacgacct 5340
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 5400
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc 5460
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5520
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcgggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580
cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt 5640
tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 5700
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgcccaatac 5760
gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gactagagtc 5820
ccgctgaggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcgggtg tcaccaaccg ggggtggaacg 5880
gcgccggtat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgttt gtgcaggttt 5940
cgcgtgttgc agtccctcgc accggcaccg gcagcgaggg gctcacgggt gccggtgggt 6000
cgactagttc agtgatggtg atggtgatgt cctcgagatc taagcttgga tccgcgcccg 6060
ctacgtagaa ttcccatatg cgctcccttc tctgacgccg tccacgctgc ctctcacgt 6120
gacgtgaggt gcaagcccgg acgttccgcg tgccacgccg tgagccgccg cgtgccgtcg 6180
gctccctcag cccgggcggc cgtgggagcc cgcctcgata tgtacaccg agaagctccc 6240
agcgtcctcc tgggcccgcga tactcgacca ccacgcacgc acaccgcact aacgattcgg 6300
ccggcgctcg attcgccgg cgctcgattc ggccggcgct cgattcgcc ggcgctcgat 6360
tcggccggcg ctcgattcgg ccgagcagaa gagtgaacaa ccaccgacca cgcttcgct 6420
ctgcgcgccg taccgacct acctcccga gctcgaagca gctcccggga gtaccgccgt 6480
actacccgc ctgtgctcac catccaccga cgcaaagccc aaccgagca cacctcttgc 6540
accaaggtgc cgaccgtggc tttccgctcg cagggttcca gaagaaatcg aacgatccag 6600

cgcggaagg ttcaaaaagc aggggttggg ggggaggagg ttttgggggg tgctgccggg 6660
atacctgata tggctttgtt ttgcgtatgc gaataatttt ccatatagcc tcggcgcgctc 6720
ggactcgaat agttgatgtg ggcgggcaca gttgccccat gaaatccgca acggggggcg 6780
tgctgagcga tcggcaatgg gcggatgcgg tgttgcttcc gcaccggccg ttcgcgacga 6840
acaacctcca acgaggtcag taccggatga gccgcgacga cgcatcggca atgcggtacg 6900
tcgagcattc accgcacgcg ttgctcgat ctatcgtcat cgactgcgat cacgttgacg 6960
ccgcgatgcg cgcattcgag caaccatccg accatccggc gccgaactgg gtcgcacaat 7020
cgccgtccgg ccgcgcacac atcggtggg ggctcggccc caaccacgtg tgccgcaccg 7080
acagcggccg actgacgcca ctgcgtacg cccaccgat cgaaaccggc ctcaagatca 7140
gcgtcggcgg cgatttcgag tatggcgggc aactgaccaa aaaccgatt caccgatt 7200
gggagacgat ctacggccc gccacccgt acacattgcg gcagctggcc accatccaca 7260
caccgga gacgacgat cgcccgatc gggccgtggg cctggggccg aacgtcacca 7320
tgctcagcg caccggcga tgggcatacc cgagtggtg gcaacaccga aacggaaccg 7380
gccgcgactg ggaccatctc gtcctgcagc actgccacgc cgtcaacacc gagttcacga 7440
caccactgcc gttcaccgaa gtacgcgcca ccgcgcaat catctccaaa tggatctggc 7500
gcaatttcac cgaagaacag taccgagccc gacaagcgca tctcgggtcaa aaaggcggca 7560
aggcaacgac actcgccaaa caagaagccg tccgaaaca tgcaagaaag tacgacgaac 7620
atacgtatgc agaggcgatt atctgatggg cggagccaaa aatccggtgc gccgaaagat 7680
gacggcagca gcagcagccg aaaaattcgg tgcctccact cgcacaatcc aacgcttgtt 7740
tgctgagccg cgtgacgatt acctcgccg tgcgaaagct cgccgtgaca aagctgtcga 7800
gctgcggaag caggggttga agtaccggga aatcgccgaa gcgatggaac tctcgaccgg 7860
gatcgtcggc cgattactgc acgacgccc caggcacggc gagatttcag cggaggatct 7920
gtcggcgtaa ccaagtcagc ggggttgcgg gttccggccg gcgctcggca ctcggaccgg 7980
ccggcggtat gtgttctgcc tctggcgag cgtcagctac cgccgaaggc ctgtcatcga 8040
ccggcttga ctgaagtatg agcaacgtca cagcctgtga ttggatgatc cgctcacgt 8100
cgaccgtac ctgttcagct gccgcccgt gggcatgagc aacggccaac tctcgttcaa 8160

<211> 8189

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector

pTip·LNH1

<400> 110

gagctcgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60
cttccccttg cgttgggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120
tcacacccca ggaatcgct cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180
ggacaccatc gcaaatccgt ccgatccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagccctca tgcacagcat 300
cgcgcccggt gtggagttca tcgaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcacgact cctcgatcgt 420
caaccagttg ttcaaggggg agcgggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480
cccggccagg ttcggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacgggggt 540
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctcgcgctcg gagcgtcggg 600
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcgac cggcgtctcc aaagggccag 660
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgctgt tctctccggt cgcgaggagg ccacgcctt 720
cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 780
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc cttgctgttc ggcagcgaaa aggggtgggcc 840
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 900
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960
tctcgggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggacgc tcggttctc gacctcgatt 1020
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080
gtggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac cccgttctca cgctttaggc ttgaccccg 1200

agcctgcatg gggcattccg ccgtgaaccc ggtggaatgc ccccggcacc cgggctttcc 1260
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa ccactccaca ggaggaccgt 1320
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcacc tggatgctgt 1380
aggcataggc ttggttatgc cggctactgcc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1440
cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgctatat gcgttgatgc aatttctatg 1500
cgcacccgtt ctcggagcac tgtccgaccg ctttggccgc cgcccagtcc tgctcgcttc 1560
gctacttgga gccactatcg actacgcgat catggcgacc acacccgtcc tgtggattct 1620
ctacgccgga cgcacgtgg cggcatcac cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgcccta 1680
tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg ggctcgccac ttcgggctca tgagcgcttg 1740
tttcggcgtg ggtatggtgg caggccccgt ggccggggga ctgttgggcg ccatctcctt 1800
gcatgcacca ttccttgccg cggcgggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1860
cctaattgcag gagtcgata agggagagcg tcgtccgatg cccttgagag ccttcaacc 1920
agtcagctcc ttccgggtggg cgcggggcat gactatcgtc gccgcactta tgactgtctt 1980
ctttatcatg caactcgtag gacagggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040
ccgctttcgc tggagcgcg ccatgatcgg cctgtcgctt gcggtattcg gaatcttgca 2100
cgccctcgct caagccttcg tcactgggtcc cgccacaaa cgtttcggcg agaagcaggc 2160
cattatcgcc ggcatggcgg ccgacgcgtt gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2220
aggctggatg gccttcccca ttatgattct tctcgcttcc ggcggcatcg ggatgccccg 2280
gttgacggcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgacat caggacagc ttcaaggatc 2340
gctcgcggtt cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgatcgtca cggcgattta 2400
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgccg ccctatacct 2460
tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcgggtg atggagccgg gccacctcga cctgaatgga 2520
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagccaa tcaattcttg 2580
cggagaactg tgaatgcgca aaccaaccct tggcagaaca tatccatcg gtccgccatc 2640
tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcatg 2700
atcgtgctcc tgtcgttgag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2760
gaatcatctg cgtttctcgc acgcaacgta cttgcaacgt tgcaactcct agtgttgtga 2820
atcacacccc accgggggggt gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg cccaggaaga 2880
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggtggcc ggcttcgccg 2940

gagtgcggt ggcacgctg caccactacg acgacatcgg cctgctcgta ccgagcgagc 3000
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgccgacct cgaccggctg cagcagatcc 3060
tgttctaccg ggagctgggc tccccgctcg acgaggctgc cgccctgctc gacgaccgg 3120
ccgcggaccc gcgcgcgcac ctgcgcccgc agcacgagct gctgtccgcc cggatcggga 3180
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3240
acctcacccc ggaggagaag ttcgaggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3300
aggaggtccg ggaacgctgg gggaacaccg acgcctaccg ccagtccaag gagaagaccg 3360
cctcgtaac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctcacccggc 3420
gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc ccgccgactc cgagggggcg atggacgccg 3480
ccgaggacca ccggcagggc atcgcccga accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgccgcca 3600
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgccgtc cggcacaccc 3660
cctgagcggg ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tactcccgg 3720
gccacgacca ccgccgtccc gtacgcgcac acctcggtgc ccacgtccgc cgcctccgctc 3780
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3840
tgcgcggaac ccctatttgt ttatTTTTct aaatacttc aaatatgtat ccgtcatga 3900
gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960
atttccgtgt cgcccttatt ccttttttg cggcattttg ccttccgtgt ttgtctacc 4020
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca 4080
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4140
caatgatgag cacttttaaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg 4200
ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gactactcac 4260
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 4320
taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380
agctaaccgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaaac 4440
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4500
caacaacggt gcgcaaaact ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4560
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 4620
ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4680

cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acgggggagtc 4740
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 4860
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980
gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag 5040
cgggtggtttg tttgccgat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5100
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca 5160
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg 5220
ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatatgta ccggataagg 5280
cgcagcggtc gggctgaacg ggggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 5340
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 5400
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggctcggaac aggagagcgc acgagggagc 5460
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5520
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580
cggccttttt acggttcttg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt 5640
tatccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 5700
gcagccgaac gaccgagcgc agcagtcag tgagcgagga agcggaagag cgccaatac 5760
gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gactagagtc 5820
ccgctgaggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcgggtg tcaccaaccg ggggtggaacg 5880
gcgccggtat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgttt gtgcaggttt 5940
cgcgtgttgc agtcctcgc accggcaccc gcagcgaggg gctcacgggt gccgggtgggt 6000
cgactagttc atcctcgaga tctaagcttg gatccgcggc cgctacgtag aattcccata 6060
tggtgatggt gatggtggcc catggtatat ctcttctta agttaaaca aaattatttc 6120
tagacgccgt ccacgtgcc tctcacgtg acgtgaggtg caagcccgga cgttccgcgt 6180
gccacgccgt gagccgccgc gtgccgtcgg ctccctcagc ccgggcggcc gtgggagccc 6240
gcctcgatat gtacaccga gaagctccca gcgtctcct gggccgcgat actcgaccac 6300
cacgcacgca caccgacta acgattcggc cggcgctcga ttcggccggc gctcgattcg 6360
gccggcgctc gattcggccg gcgctcgatt cggccggcgc tcgattcggc cgagcagaag 6420

agtgaacaac caccgaccac gcttccgctc tgcgcgccgt acccgaccta cctcccgag 6480
ctcgaagcag ctcccgaggag taccgccgta ctacccgcc tgtgctcacc atccaccgac 6540
gcaaagccca acccgagcac acctcttgca ccaaggtgcc gaccgtggct ttccgctcgc 6600
agggttccag aagaaatcga acgatccagc gcggcaaggt tcaaaaagca ggggttggtg 6660
gggaggagggt tttgggggggt gtcgccggga tacctgatat ggctttgttt tgcgtagtcg 6720
aataattttc catatagcct cggcgcgctc gactcgaata gttgatgtgg gcgggcacag 6780
ttgcccatg aaatccgcaa cggggggcgt gctgagcgat cggcaatggg cggatgcggt 6840
gttgcttccg caccggccgt tcgcgacgaa caacctcaa cgaggtcagt accggatgag 6900
ccgcgacgac gcattggcaa tgcggtacgt cgagcattca ccgcacgcgt tgctcggatc 6960
tatcgtcatc gactgcgac acgttgacgc cgcgatgcgc gcattcgagc aacctccga 7020
ccatccggcg ccgaactggg tcgcacaatc gccgtccggc cgcgcacaca tcggatggtg 7080
gctcggcccc aaccacgtgt gccgcaccga cagcgcccga ctgacgccac tgcgctacgc 7140
ccaccgcac gaaaccggcc tcaagatcag cgtcggcggc gatttcgcgt atggcgggca 7200
actgacaaaa aacccgattc accccgattg ggagacgac tacggcccgg ccaccccgta 7260
cacattgcgg cagctggcca ccatccacac accccggcag atgccgcgtc ggcccgatcg 7320
ggccgtgggc ctgggccgca acgtcaccat gttcgacgcc acccggcgat gggcataccc 7380
gcagtgggtg caacaccgaa acggaaccgg ccgcgactgg gaccatctcg tcctgcagca 7440
ctgccacgcc gtcaacaccg agttcacgac accactgccg ttcaccgaag tacgcgccac 7500
cgcgcaatcc atctccaaat ggatctggcg caatttcacc gaagaacagt accgagcccg 7560
acaagcgcac ctccgtcaaa aaggcggcaa ggcaacgaca ctgcctcaaac aagaagccgt 7620
ccgaaacaat gcaagaaagt acgacgaaca tacgatgcga gaggcgatta tctgatgggc 7680
ggagccaaaa atccggtgcg ccgaaagatg acggcagcag cagcagccga aaaattcggt 7740
gcctccactc gcacaatcca acgcttggtt gctgagccgc gtgacgatta cctcggccgt 7800
gcgaaagctc gccgtgaaa agctgtcgag ctgcggaagc aggggttgaa gtaccgggaa 7860
atcgccgaag cgatggaact ctgaccggg atcgtcggcc gattactgca cgacccccgc 7920
aggcacggcg agatttcagc ggaggatctg tcggcgtaac caagtcagcg ggttgtcggg 7980
ttccggcccg cgctcggcac tcggaccggc cggcggatgg tgttctgcct ctggcgacgc 8040
gtcagctacc gccgaaggcc tgtcatcgac cggcttcgac tgaagtatga gcaacgtcac 8100
agcctgtgat tggatgatcc gtcacgctc gaccgtacc tggtcagctg ccgcccgctg 8160

ggcatgagca acggccaact ctcgttcaa

8189

<210> 111

<211> 8183

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector

pTip·LNH2

<400> 111

gagctcgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60
cttccccttg cgttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120
tcacacccca ggaatcgcgt cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180
ggacaccatc gcaaattcgt ccgatccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagcccctca tgcacagcat 300
cgcgggccggg gtggagttca tcgaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420
caaccagttg ttcaaggggg agcggaaggc caagacattc ggcacgccc gcgtccctcg 480
cccggccagg ttcggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacgggggt 540
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctcgcgctcg gagcgtcggg 600
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcgac cggcgtctcc aaagggccag 660
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgtcgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgcctt 720
cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 780
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc cttgctgttc ggcagcgaaa aggggtgggcc 840
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 900
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960

tctcgcggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggacgc tcggttcctc gacctcgatt 1020
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080
gtgggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac cccgtttctca cgcttttaggc ttgacccccg 1200
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaaccc ggtggaatgc ccccggcacc cgggctttcc 1260
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa ccactccaca ggaggaccgt 1320
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcacc tggatgctgt 1380
aggcataggc ttggttatgc cggctactgcc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1440
cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgctatat gcgttgatgc aatttctatg 1500
cgcacccgtt ctcggagcac tgtccgaccg ctttggccgc cgcccagtc tgctcgcttc 1560
gctacttggg gccactatcg actacgcgat catggcgacc acacccgtcc tgtggattct 1620
ctacgccgga cgcacgtgg ccggcatcac cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgcccta 1680
tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg ggctcgccac ttcgggctca tgagcgcttg 1740
tttcggcgtg ggtatggtgg caggccccgt ggccggggga ctgttgggcg ccatctcctt 1800
gcatgcacca ttccttgcgg cggcgggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1860
cctaatgcag gagtcgcata agggagagcg tcgtccgatg cccttgagag cttcaaccc 1920
agtcagctcc ttccggtggg cgcggggcat gactatcgtc gccgcactta tgactgtctt 1980
ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040
ccgctttcgc tggagcgca cgatgatcgg cctgtcgctt gcggtattcg gaatcttgca 2100
cgccctcgct caagccttcg tactgggtcc cgccaccaa cgtttcggcg agaagcaggc 2160
cattatcgcc ggcatggcgg ccgacgcgt gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2220
aggctggatg gccttcccca ttatgattct tctcgcttcc ggcggcacgc ggatgcccgc 2280
gttcgaggcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgacat caggacagc ttcaaggatc 2340
gctcgcggct cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgatcgtca cggcgattta 2400
tgccgcctcg gcgagcat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgccg ccctatacct 2460
tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcggtgc atggagccgg gccacctcga cctgaatgga 2520
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagccaa tcaattcttg 2580
cggagaactg tgaatgcgca aaccaaccct tggcagaaca tatccatcgc gtccgccatc 2640
tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcatg 2700

atcgtgctcc tgtcgttgag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2760
gaatcatctg cgtttctcgc acgcaacgta cttgcaacgt tgcaactcct agtgttgta 2820
atcacacccc accgggggggt gggattgcag tcaccgatit ggtgggtgcg cccaggaaga 2880
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acagggtggcc ggcttcgccg 2940
gagtgcggt ggcgcacgtg caccactacg acgacatcgg cctgctcgta ccgagcgagc 3000
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgccgacct cgaccggctg cagcagatcc 3060
tgttctaccg ggagctgggc ttcccgctcg acgaggtcgc cgccctgctc gacgacccgg 3120
ccgcggaccc gcgcgcgcac ctgcgccgcc agcacgagct gctgtccgcc cggatcggga 3180
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3240
acctacccc ggaggagaag ttcgaggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3300
aggaggtccg ggaacgctgg gggaacaccg acgcctaccg ccagtccaag gagaagaccg 3360
cctcgtacac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctcacccggc 3420
gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc ccgccgactc cgagggggcg atggacgccg 3480
ccgaggacca ccggcagggc atgcccgcga accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgccgcca 3600
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgccgtc cggcacaccc 3660
cctgagcgtt ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tctactcccg 3720
gccacgacca ccgccgtccc gtacgcgcac acctcggtgc ccacgtccgc cgcctccgtc 3780
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3840
tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacatc aaatatgtat ccgctcatga 3900
gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960
atttccgtgt cgcccttatt cccttttttg cggcattttg cttcctgtt tttgctcacc 4020
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca 4080
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4140
caatgatgag cactttttaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg 4200
ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac 4260
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 4320
taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380
agctaaccgc tttttgcac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac 4440

cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4500
caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4560
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 4620
ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4680
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acgggggagtc 4740
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 4860
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980
gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag 5040
cgggtggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5100
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca 5160
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg 5220
ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccgataagg 5280
cgcagcggtc gggctgaacg ggggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 5340
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 5400
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc 5460
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5520
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580
cggccttttt acggttcctg gccctttgct ggccttttgc tcacatgttc tttctgcgt 5640
tatccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 5700
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgccaatac 5760
gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gactagagtc 5820
ccgctgaggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcgggtg tcaccaaccg ggggtggaacg 5880
gcgccggtat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgttt gtgcaggttt 5940
cgctgtttgc agtccctcgc accggcaccc gcagcgaggg gctcacgggt gccggtgggt 6000
cgactagtgc agtgatggtg atggtgatgt cctcgagatc taagcttgga tccgcggccg 6060
ctacgtagaa ttcccatggt atatctcctt cttaaagtta aacaaaatta tttctagacg 6120
ccgtccacgc tgcctcctca cgtgacgtga ggtgcaagcc cggacgttcc gcgtgccacg 6180

ccgtgagccg ccgctgccc tgggtccct cagcccgggc ggccgtggga gcccgcctcg 6240
atatgtacac ccgagaagct cccagcgtcc tcctgggccc cgatactcga ccaccacgca 6300
cgcacaccgc actaacgatt cggccggcgc tcgattcggc cggcgtcga ttcggccggc 6360
gctcgattcg gccggcgtc gattcggccg gcgctcgatt cggccgagca gaagagtga 6420
caaccaccga ccacgcttcc gctctgcgc cgtaccga cctacctcc gcagctcga 6480
gcagctccc ggagtaccgc cgtactacc cgcctgtgct caccatccac cgacgcaaag 6540
cccaaccga gcacacctt tgcaccaagg tgccgaccgt ggctttccgc tcgcagggtt 6600
ccagaagaaa tcgaacgac cagcgcggca aggttcaaaa agcaggggtt ggtggggagg 6660
aggttttggg ggggtgccc gggatactg atatggcttt gttttgcga gtcgaataat 6720
tttccatata gcctcggcgc gtcggactcg aatagttgat gtggcgggc acagttgcc 6780
catgaaatcc gcaacgggg gcgtgctgag cgatcgcaa tggcggatg cgggtgtgct 6840
tccgcaccgg ccgttcgca cgaacaacct ccaacgaggt cagtaccgga tgagccgca 6900
cgacgcattg gcaatgcggt acgtcgagca ttcaccgcac gcgttgctcg gatctatcg 6960
catcgactgc gatcacgtt acgccgcgat gcgcgcattc gagcaaccat ccgaccatcc 7020
ggcgccgaac tgggtgcac aatcgccgc cggccgcga cacatcgat ggtggctcg 7080
ccccaacac gtgtgccga ccgacagcgc ccgactgac cactgcgt acgcccaccg 7140
catcgaacc ggctcaaga tcagcgtcgg cggcgatttc gcgtatggcg ggcaactgac 7200
caaaaacccg attcaccg attgggagac gatctacggc ccggccacc cgtacacatt 7260
gcggcagctg gccaccatcc acacacccg gcagatgccg cgtcggccc atcgggccc 7320
gggcctgggc cgcaacgtca ccatgttcga cgccaccg cgatgggcat accgcagtg 7380
gtggcaacac cgaaacggaa ccggccgca ctgggacat ctgctctgc agcactgcca 7440
cgccgtcaac accgagttca cgacaccact gccgttacc gaagtacgc ccaccgcga 7500
atccatctcc aaatggatct ggcgcaattt caccgaaga cagtaccgag ccgacaagc 7560
gcatctcgt caaaaaggcg gcaaggcaac gacactgcc aaacaagaag ccgtccgaaa 7620
caatgaaga agtacgacg aacatacgat gcgagaggcg attatctgat gggcggagcc 7680
aaaaatccg tgcgccgaaa gatgacggca gcagcagcag ccgaaaaatt cggtcctcc 7740
actgcacaa tccaacgctt gtttgctgag ccgctgacg attacctcg ccgtgcgaaa 7800
gctcgcctg acaaagctgt cgagctcgg aagcaggggt tgaagtacc ggaaatcgcc 7860
gaagcgatgg aactctgac cgggatcgt gcccgattac tgcacgacgc ccgcaggcac 7920

ggcgagattt cagcggagga tctgtcggcg taaccaagtc agcgggttgt cgggttccgg 7980
ccggcgctcg gcactcggac cggccggcgg atggtgttct gcctctggcg cagcgtcagc 8040
taccgccgaa ggctgtcat cgaccggctt cgactgaagt atgagcaacg tcacagcctg 8100
tgattggatg atccgtcac gctcgaccgc tacctgttca gctgccgccc gctgggcatg 8160
agcaacggcc aactctcgtt caa 8183

<210> 112

<211> 8123

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector
pTip·LCH1

<400> 112

gagctcgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60
cttccccttg cgttggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtaggggtg 120
tcacacccca ggaatcgct cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180
ggacaccatc gcaaatccgt ccgatcccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagcccctca tgcacagcat 300
cgcgggccggg gtggagttca tcgaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420
cccggccagg ttcggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacggggt 480
gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgctcg gagcgtcggg 540
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcggac cggcgtctcc aaagggccag 600
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgctgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgcctt 660
cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 720

ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc cttgctgttc ggcagcgaaa aggggtgggcc 780
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 840
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 900
tctcgcggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggacgc tcggttcctc gacctcgatt 960
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1020
gtgggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1080
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac cccgtttctca cgcttttaggc ttgaccccgg 1140
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaaccc ggtggaatgc ccccggcacc cgggctttcc 1200
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa ccactccaca ggaggaccgt 1260
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcacc tggatgctgt 1320
aggcataggc ttggttatgc cggctactgc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1380
cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgctatat gcgttgatgc aatttctatg 1440
cgcacccgtt ctcggagcac tgtccgaccg ctttggccgc cgcccagtcc tgctcgcttc 1500
gctacttggg gccactatcg actacgcgat catggcgacc acaccgtcc tgtggattct 1560
ctacgccgga cgcacgtggt ccggcatcac cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgccta 1620
tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg ggctcgccac ttcgggctca tgagcgcttg 1680
tttcggcgtg ggtatggtgg caggccccgt ggccggggga ctgttgggcg ccatctcctt 1740
gcatgcacca ttccttgcgg cggcggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1800
cctaatacgag gagtcgcata agggagagcg tcgtccgatg cccttgagag cttcaaccc 1860
agtcagctcc ttccggtggg cgcggggcat gactatcgtc gccgcactta tgactgtctt 1920
ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 1980
ccgctttcgc tggagcgga cgatgatcgg cctgtcgctt gcggtattcg gaatcttgca 2040
cgccctcgct caagccttcg tcaactggctc cgccacaaa cgtttcggcg agaagcaggc 2100
cattatcgcc ggcattggcg ccgacgcgct gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2160
aggctggatg gccttcccca ttatgattct tctcgcttcc ggcggcacgc ggatgccccg 2220
gttgaggcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgacat cagggacagc ttcaaggatc 2280
gctcgcggct cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgatcgtca cggcgattta 2340
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgccg ccctatacct 2400
tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcggtgc atggagccgg gccacctcga cctgaatgga 2460

agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagccaa tcaattcttg 2520
cggagaactg tgaatgcgca aaccaaccct tggcagaaca tatccatcgc gtccgccatc 2580
tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcatg 2640
atcgtgctcc tgtcgttgag gactagaatt gatctctcgc accgccaatt gggcatctga 2700
gaatcatctg cgtttctcgc acgcaacgta cttgcaacgt tgcaactcct agtgttgtga 2760
atcacacccc accgggggggt gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg cccaggaaga 2820
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggtggcc ggcttcgccg 2880
gagtgcgggt gcgcacgctg caccactacg acgacatcgg cctgctcgta ccgagcgagc 2940
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgccgacct cgaccggctg cagcagatcc 3000
tgttctaccg ggagctgggc ttcccgtcgc acgaggtcgc cgccctgctc gacgaccggg 3060
ccgcggaccc gcgcgcgcac ctgcgccgcc agcacgagct gctgtccgcc cggatcggga 3120
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3180
acctacccc ggaggagaag ttcgaggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3240
aggaggtccg ggaacgctgg gggaacaccg acgcctaccg ccagtccaag gagaagaccg 3300
cctcgtacac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctacccggc 3360
gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc ccgccgactc cgagggggcg atggacgccg 3420
ccgaggacca ccggcagggc atcgcccgca accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3480
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgccgcca 3540
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgccgtc cggcacaccc 3600
cctgagcggg ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tcaactcccg 3660
gccacgacca ccgccgtccc gtacgcgcac acctcgggtc ccacgtccgc cgcctccgtc 3720
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3780
tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacttc aaatatgtat ccgctcatga 3840
gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaag gaagagtatg agtattcaac 3900
atttcgtgt cgcccttatt cccttttttg cggcattttg ccttcctgtt tttgctcacc 3960
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca 4020
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4080
caatgatgag cacttttaaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccg attgacgccg 4140
ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac 4200

cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgccca 4260
taaccatgag tgataaact gcgccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4320
agctaaccgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac 4380
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4440
caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4500
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 4560
ctggctgggt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcg ggtatcattg 4620
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4680
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4740
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 4800
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4860
aacgtgagtt ttcgttcac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4920
gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag 4980
cggtggtttg tttgccgat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5040
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagttagacc gtagttaggc caccacttca 5100
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg 5160
ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccgataagg 5220
cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 5280
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 5340
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc 5400
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5460
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5520
cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt 5580
tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 5640
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgccaatac 5700
gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gactagagtc 5760
ccgctgaggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcgggtg tcaccaaccg gggtggaacg 5820
gcgccggtat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgttt gtgcaggttt 5880
cgcggtgtgc agtccctcgc accggcaccg gcagcgaggg gctcacgggt gccggtgggt 5940

cgactagttc agtgatggtg atggtgatgt cctcgagatc taagcttgga tccgcggccg 6000
ctacgtagaa tttccatggt atatctcctt cttaaagtta aacaaaatta tttctagacg 6060
ccgtccacgc tgcctcctca cgtgacgtga ggtgcaagcc cggacgttcc gcgtgccacg 6120
ccgtgagccg ccgcgtgccg tcggctccct cagcccgggc ggccgtggga gcccgcctcg 6180
atatgtacac ccgagaagct cccagcgtcc tcctgggccc cgatactcga ccaccacgca 6240
cgcacaccgc actaacgatt cggccggcgc tcgattcggc cggcgctcga ttcggccggc 6300
gctcgattcg gccggcgctc gattcggccc gcgctcgatt cggccgagca gaagagtga 6360
caaccaccga ccacgcttcc gctctgcgcg ccgtaccga cctacctccc gcagctcgaa 6420
gcagctcccg ggagtaccgc cgtactcacc cgcctgtgct caccatccac cgacgcaaag 6480
cccaaccga gcacacctt tgcaccaagg tgccgaccgt ggctttccgc tcgcagggtt 6540
ccagaagaaa tcgaacgatc cagcgcggca aggttcaaaa agcaggggtt ggtggggagg 6600
aggttttggg ggggtgcgcc gggatactg atatggcttt gtttgcgta gtcgaataat 6660
tttccatata gcctcggcgc gtcggactcg aatagttgat gtgggcgggc acagttgcc 6720
catgaaatcc gcaacggggg gcgtgctgag cgatcggcaa tgggcggatg cgggtgttgc 6780
tccgcaccgg ccgttcgca cgaacaacct ccaacgaggt cagtaccgga tgagccgcga 6840
cgacgcattg gcaatgcggt acgtcgagca ttcaccgcac gcgttgctcg gatctatcgt 6900
catcgactgc gatcacgttg acgccgcat gcgcgcattc gagcaaccat ccgaccatcc 6960
gggcgccgaac tgggtcgcac aatcgccgtc cggccgcgca cacatcggat ggtggctcgg 7020
ccccaaccac gtgtgccga cgcacagcgc ccgactgacg cactgcgct acgcccaccg 7080
catcgaaacc ggcctcaaga tcagcgtcgg cggcgatttc gcgtatggcg ggcaactgac 7140
caaaaacccg attcaccgcg attgggagac gatctacggc ccggccacc cgtacacatt 7200
gcggcagctg gccaccatcc acacaccccg gcagatgccg cgtcggcccg atcgggcccgt 7260
gggcctgggc cgcaacgtca ccatgttcga cgccaccgg cgatgggcat accgcagtg 7320
gtggcaacac cgaaacggaa ccggccgca ctgggacat ctcgtcctgc agcactgcca 7380
cgccgtcaac accgagttca cgacaccact gccgttcacc gaagtacgcg ccaccgcgca 7440
atccatctcc aaatggatct ggcgcaattt caccgaagaa cagtaccgag cccgacaagc 7500
gcatctcggt caaaaaggcg gcaaggcaac gacactcgcc aaacaagaag ccgtccgaaa 7560
caatgcaaga aagtacgacg aacatacgat gcgagaggcg attatctgat gggcggagcc 7620
aaaaatccgg tgcgccgaaa gatgacggca gcagcagcag ccgaaaaatt cgggtgcctcc 7680

actcgacaaa tccaacgctt gtttgctgag ccgctgacg attacctcgg ccgtgcgaaa 7740
 gctcgccgtg acaaagctgt cgagctgcgg aagcaggggt tgaagtaccg ggaaatcgcc 7800
 gaagcgatgg aactctcgac cgggatcgtc ggccgattac tgcacgacgc ccgcaggcac 7860
 ggcgagattt cagcggagga tctgtcggcg taaccaagtc agcgggttgt cgggttccgg 7920
 ccggcgctcg gcactcggac cggccggcgg atggtgttct gcctctggcg cagcgtcagc 7980
 taccgccgaa ggctgtcat cgaccggctt cgactgaagt atgagcaacg tcacagcctg 8040
 tgattggatg atccgctcac gctcgaccgc tacctgttca gctgccgccc gctgggcatg 8100
 agcaacggcc aactctcgctt caa 8123

<210> 113

<211> 8184

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector

pTip-LCH2

<400> 113

gagctcgacc gcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60
 cttccccttg cgttggatg tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgtagggtg 120
 tcacacccca ggaatcgct cactgaacac agcagccggt aggacgacca tgactgagtt 180
 ggacaccatc gcaaattcgt ccgatccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240
 gtcacgatcc aacataaaga caacgttgat cgaggacgtc gagcccctca tgcacagcat 300
 cgcggccggg gtggagtcca tcgaggctta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360
 gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420
 caaccagttg ttcaaggggg agcggaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480
 cccggccagg ttcggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgttc tcgacggggt 540

gaagatcgtc gggaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgctcg gagcgtcggg 600
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgcggac cggcgtctcc aaagggccag 660
ccgaggttac gtcttctccc ttcccgctgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgctt 720
cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca ttccgtgaa 780
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc cttgctgttc ggcagcgaaa aggggtgggccc 840
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atcccatga tgagccagac 900
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960
tctcggggcc aaccgataag cgctctgtt cctcggacgc tcggttctc gacctcgatt 1020
cgtcagtgat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080
gtggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac cccgttctca cgctttaggc ttgaccccg 1200
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaaccc ggtggaatgc ccccggcacc cgggctttcc 1260
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa cactccaca ggaggaccgt 1320
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcacc tggatgctgt 1380
aggcataggc ttggttatgc cggtagtgc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1440
cagcatcgcc agtcactatg gcgtgctgct agcgtatat gcgttgatgc aatttctatg 1500
cgcaccggtt ctcgagcac tgtccgaccg ctttggccgc cgcccagtcc tgctcgcttc 1560
gctacttggg gccactatcg actacgcgat catggcgacc acaccgtcc tgtggattct 1620
ctacgccgga cgcatcgtgg ccggcatcac cggcgccaca ggtgcggttg ctggcgcta 1680
tatcgccgac atcaccgatg gggaagatcg ggctcgccac ttcgggctca tgagcgcttg 1740
tttcggcgtg ggtatggtgg caggccccgt ggccggggga ctgttgggcg ccatctcctt 1800
gcatgcacca ttccttgcgg cggcggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1860
cctaatgcag gagtcgcata agggagagcg tcgtccgatg cccttgagag ccttcaaccc 1920
agtcagctcc ttccggtggg cgcggggcat gactatcgtc gccgcactta tgactgtctt 1980
ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040
ccgctttcgc tggagcgga cgatgatcgg cctgtcgctt gcggtattcg gaatcttgca 2100
cgccctcgct caagccttcg tctgtgtcc cgccacaaa cgtttcggcg agaagcaggc 2160
cattatcgcc ggcatggcgg ccgacgcgt gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2220
aggctggatg gccttccca ttatgattct tctcgcttcc ggcggcatcg ggatgcccgc 2280

gttcgaggcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgacat cagggacagc ttcaaggatc 2340
gctcgcggct cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgatcgtca cggcgattta 2400
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgccg ccctatacct 2460
tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcgggtgc atggagccgg gccacctcga cctgaatgga 2520
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagccaa tcaattcttg 2580
cggagaactg tgaatgcga aaccaaccct tggcagaaca tatccatcgc gtccgccatc 2640
tccagcagcc gcacgcggcg catctcgggc agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcatg 2700
atcgtgctcc tgctgttag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2760
gaatcatctg cgtttctcgc acgcaacgta cttgcaacgt tgcaactcct agtgttgtga 2820
atcacacccc accgggggggt gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg cccaggaaga 2880
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggtggcc ggcttcgccg 2940
gagtgcagggt gcgcacgctg caccactacg acgacatcgg cctgctcgtc cggagcgagc 3000
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgccgacct cgaccggctg cagcagatcc 3060
tgttctaccg ggagctgggc ttcccgtcgc acgaggtcgc cgccctgctc gacgaccggg 3120
ccgcggaccc gcgcgcgcac ctgcgccgcc agcacgagct gctgtccgcc cggatcggga 3180
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3240
acctacccc ggaggagaag ttcgaggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3300
aggaggtccg ggaacgctgg gggaacaccg acgcctaccg ccagtccaag gagaagaccg 3360
cctcgtacac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctacccggc 3420
gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc ccgccgactc cgagggggcg atggacgccg 3480
ccgaggacca ccggcagggc atgccccgca accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgccgcca 3600
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgccgtc cggcacaccc 3660
cctgagcgggt ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tcaactcccg 3720
gccacgacca ccgccgtccc gtacgcgcac acctcgggtgc ccacgtccgc cgcctccgtc 3780
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3840
tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga 3900
gacaataacc ctgataaatg ctcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960
atttcctgtt cgcccttatt cccttttttg cggcattttg ccttcctgtt tttgctcacc 4020

cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca 4080
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4140
caatgatgag cactttttaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg 4200
ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac 4260
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcc 4320
taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380
agctaaccgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac 4440
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cagcatgcct gtagcaatgg 4500
caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4560
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttcgg 4620
ctggctgggt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcg ggtatcattg 4680
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4740
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatactta gattgattta aaacttcatt 4860
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc ttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag acccctaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980
gagatccttt ttttctgcg gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgtaccag 5040
cgggtggttg tttgccgat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5100
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagtgtagcc gtagttaggc caccattca 5160
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg 5220
ccagtggcga taagtcgtgt ctaccgggt tggactcaag acgatatgta ccggataagg 5280
cgcagcggtc gggctgaacg ggggggttctg gcacacagcc cagcttgag cgaacgacct 5340
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 5400
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggctcggaac aggagagcgc acgagggagc 5460
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5520
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580
cggccttttt acggttcctg gccttttctt ggccttttgc tcacatgttc tttctgcgt 5640
tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 5700
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgcccaatac 5760

gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gactagagtc 5820
ccgctgaggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcgggtg tcaccaaccg ggggtggaacg 5880
gcgcgcgtat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgttt gtgcaggttt 5940
cgctgtttgc agtcctcgc accggcaccg gcagcgaggg gtcacgggt gccgggtgggt 6000
cgactagttc agtgatgggt atggtgatgt cctcgagatc taagcttgga tccgcggccg 6060
ctacgtagaa ttcccatatg tatatctcct tcttaaagtt aaacaaaatt atttctagac 6120
gccgtccacg ctgcctctc acgtgacgtg aggtgcaagc ccggacgttc cgctgcccac 6180
gccgtgagcc gccgcgtgcc gtcggctccc tcagcccggg cggccgtggg agcccgctc 6240
gatatgtaca cccgagaagc tcccagcgtc ctcctgggcc gcgatactcg accaccacgc 6300
acgcacaccg cactaacgat tcggccggcg ctcgattcgg ccggcgctcg attcggccgg 6360
cgctcgattc ggccggcgct cgattcggcc ggcgctcgat tcggccgagc agaagagtga 6420
acaaccaccg accacgttc cgctctgcgc gccgtaccg acctacctc cgcagctcga 6480
agcagctccc gggagtaccg ccgtactcac ccgcctgtgc tcaccatcca ccgacgcaa 6540
gccaaccg agcacacctc ttgcaccaag gtgccgaccg tggctttccg ctcgcagggt 6600
tccagaagaa atcgaacgat ccagcgcggc aaggttcaa aagcaggggt tgggtggggag 6660
gaggttttgg ggggtgtcgc cgggatacct gatatggctt tgttttgcgt agtcgaataa 6720
ttttccatat agcctcggcg cgtcggactc gaatagtga tgtgggcggg cacagttgcc 6780
ccatgaaatc cgcaacgggg ggcgtgctga gcgatcggca atgggcggat gcggtgttgc 6840
ttccgcaccg gccgttcgcg acgaacaacc tccaacgagg tcagtaccg atgagccgcg 6900
acgacgcatt ggcaatgcgg tacgtcgagc attcaccgca cgcgttgctc ggatctatcg 6960
tcatcgactg cgatcacgtt gacgccgcga tgcgcgcatt cgagcaacca tccgaccatc 7020
cggcgccgaa ctgggtcgca caatcgccgt ccggccgcgc acacatcgga tgggtggctcg 7080
gccccacca cgtgtgccgc accgacagcg cccgactgac gccactgcgc tacgcccacc 7140
gcatcgaaac cggcctcaag atcagcgtcg gcggcgattt cgcgtatggc gggcaactga 7200
ccaaaaaccc gattcaccac gattgggaga cgatctacgg cccggccacc ccgtacacat 7260
tgccgcagct ggccaccatc cacacacccc ggcagatgcc gcgtcggccc gatcgggccc 7320
tgggcctggg ccgcaacgtc accatgttcg acgccacccg gcgatgggca taccgcagt 7380
ggtggcaaca ccgaaacgga accggccgcg actgggacca tctcgtcctg cagcactgcc 7440
acgccgtcaa caccgagttc acgacaccac tgccgttcac cgaagtacgc gccaccgcgc 7500

aatccatctc caaatggatc tggcgcaatt tcaccgaaga acagtaccga gcccgacaag 7560
cgcatctcgg tcaaaaaggc ggcaaggcaa cgacactcgc caaacaagaa gccgtccgaa 7620
acaatgcaag aaagtacgac gaacatacga tgcgagaggc gattatctga tgggcggagc 7680
caaaaatccg gtgcgccgaa agatgacggc agcagcagca gccgaaaaat tcggtgcctc 7740
cactcgcaca atccaacgct tgtttgctga gccgcgtgac gattacctcg gccgtgcgaa 7800
agctcgccgt gacaaagctg tcgagctcgc gaagcagggg ttgaagtacc gggaaatcgc 7860
cgaagcgatg gaactctcga ccgggatcgt cggccgatta ctgcacgacg cccgcaggca 7920
cggcgagatt tcagcggagg atctgtcggc gtaaccaagt cagcgggttg tcgggttccg 7980
gccggcgctc ggcaactcgga ccggccggcg gatggtgttc tgcctctggc gcagcgtcag 8040
ctaccgccga aggctgtca tcgaccggct tcgactgaag tatgagcaac gtcacagcct 8100
gtgattggat gatccgctca cgctcgaccg ctacctgttc agctgccgcc cgctgggcat 8160
gagcaacggc caactctcgt tcaa 8184

【0162】

【配列表フリーワード】

配列 1 ~ 105 : プライマー

配列 106 ~ 113 : ベクター

【図面の簡単な説明】

【図1】

誘導型発現ベクターのバックボーンになるプラスミドpHN136の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置をしめす。数字は塩基対（キロベースペア：kb）を示す。

【図2】

チオストレプトン耐性遺伝子を持つプラスミドpHN143の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置をしめす。数字は塩基対（キロベースペア：kb）を示す。CIAPはCalf Intestine Alkaline Phosphataseを、Blu.は平滑末端（Blunt end）を意味する。

【図3】

Inducer cassetteを持つプラスミドpHN62の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置をしめす。数字は塩基対（キロベースペア：kb）を示す。

示す。Blu. は平滑末端 (Blunt end) を意味する。

【図 4】

Expression cassetteを持つプラスミド pHN153 の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置をしめす。数字は塩基対 (キロベースペア: kb) を示す。CIAP は (Calf Intestine Alkaline Phosphatase) を Blu. は平滑末端 (Blunt end) を意味する。

【図 5】

テトラサイクリン耐性遺伝子を持つプラスミド pHN169 の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置をしめす。数字は塩基対 (キロベースペア: kb) を示す。CIAP は Calf Intestine Alkaline Phosphatase を、Blu. は平滑末端 (Blunt end) を意味する。

【図 6】

PIP をレポーター遺伝子として持つ誘導型発現ベクタープラスミド pHN170、pHN171 の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置を示す。数字は塩基対 (キロベースペア: kb) を示す。CIAP は Calf Intestine Alkaline Phosphatase を意味する。

【図 7】

マルチクローニング部位を持つ誘導型発現ベクタープラスミド pTip-NH1、pTip-CH1、pTip-LNH1、pTip-LCH1 の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置をしめす。数字は塩基対 (キロベースペア: kb) を示す。

【図 8】

マルチクローニング部位を持つ誘導型発現ベクタープラスミド pTip-NH2、pTip-CH2、pTip-LNH2、pTip-LCH2 の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置をしめす。数字は塩基対 (キロベースペア: kb) を示す。

【図 9 a】

a) pTip-NH1、pTip-CH1、pTip-LNH1、pTip-LNH1、pTip-NH2、pTip-CH2、pTip-LNH2、pTip-LCH2 のマップを示す図である。各領域の機能と、プラスミドのマップを示す。

【図 9 b】

b) pTip-NH1、pTip-LNH1のTipA遺伝子プロモーター配列、またはTipA-LG10プロモーター配列から、マルチクロニング部位、ThcA遺伝子転写終結配列までのDNA配列を示す。

【図 9 c】

c) pTip-CH1、pTip-LCH1のTipA遺伝子プロモーター配列、またはTipA-LG10プロモーター配列から、マルチクロニング部位、ThcA遺伝子転写終結配列までのDNA配列を示す。

【図 9 d】

d) pTip-NH2、pTip-LNH2のTipA遺伝子プロモーター配列、またはTipA-LG10プロモーター配列から、マルチクロニング部位、ThcA遺伝子転写終結配列までのDNA配列を示す。

【図 9 e】

e) pTip-CH2、pTip-LCH2のTipA遺伝子プロモーター配列、またはTipA-LG10プロモーター配列から、マルチクロニング部位、ThcA遺伝子転写終結配列までのDNA配列を示す。

【図 10】

pTip-CH1.1、pTip-LCH1.1、pTip-CH2.1およびpTip-LCH2.1のマップを示す図である。

【図 11】

PIP活性測定のためのコントロールプラスミドpHN172、pHN173の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置を示す。数字は塩基対（キロベースパー：kb）を示す。また、CIAPはCalf Intestine Alkaline Phosphataseを意味する。pHN170は、「Expression cassette」と「Inducer cassette」両方をもつものに対して、pHN173は「Expression cassette」のみをもち、pHN172は両cassetteを持たない。

【図 12】

誘導型発現ベクターを用いたPIP活性の測定1の結果を示す図である。

【図 13】

誘導型発現ベクターを用いたPIP活性の測定2 aの結果を示す図である。

【図 14】

誘導型発現ベクターを用いたPIP活性の測定 2 b を示す図である。

【図 15】

誘導型発現ベクターを用いたPIP活性の測定 3 の結果を示す図である。

【図 16】

誘導型発現ベクターを用いた外来タンパク質の精製 1 の結果を示す図である。

【図 17】

誘導型発現ベクターを用いた外来タンパク質の精製 2 の結果を示す図である。

【図 18】

誘導型発現ベクターを用いた外来タンパク質の精製 3 a の結果を示す図である。

【図 19】

誘導型発現ベクターを用いた外来タンパク質の精製 3 b の結果を示す図である。

【図 20】

大腸菌の増殖を30℃で阻害するタンパク質のリストを示す図である。

【図 21】

Rhodococcus erythropolis、大腸菌を宿主とした外来タンパク質の発現を示す図である。

【図 22】

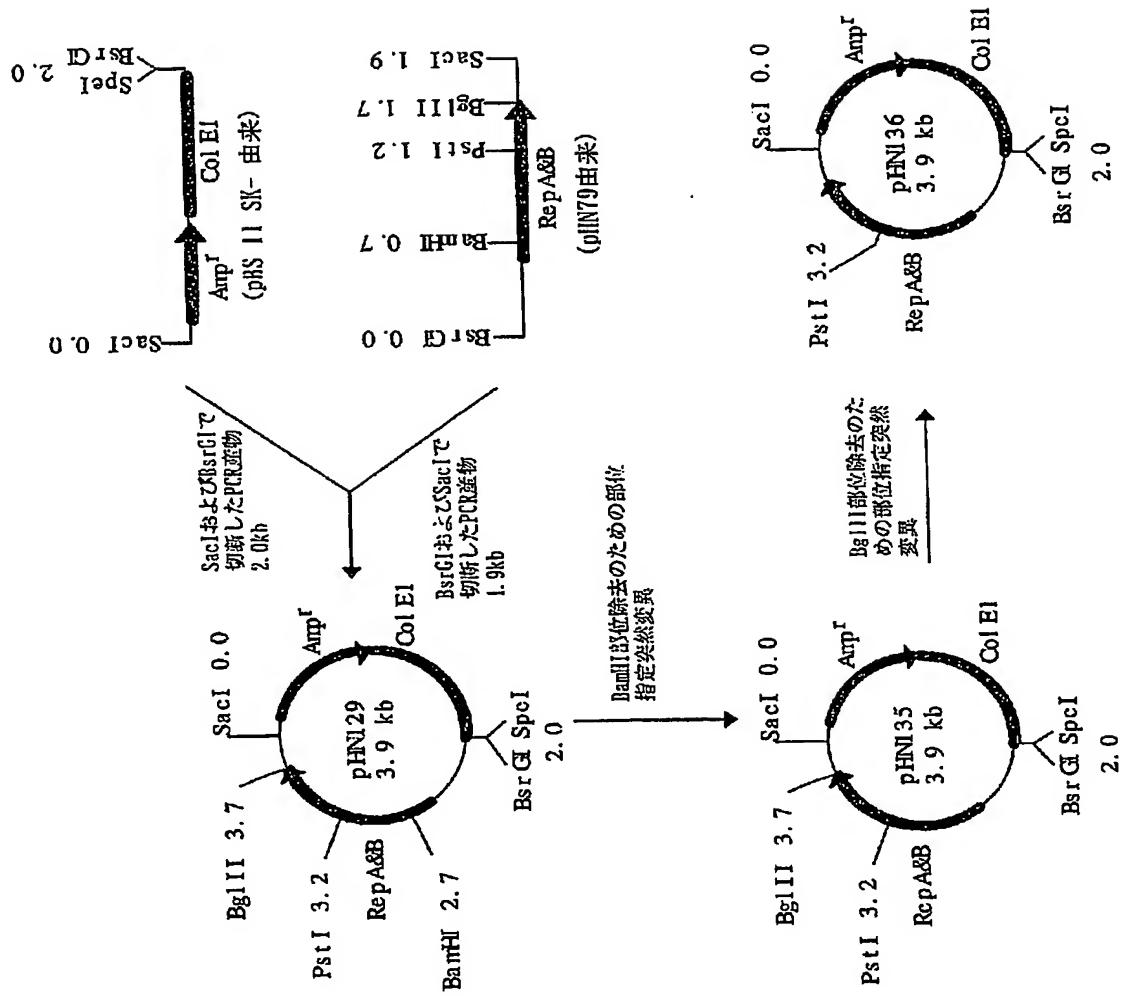
TipA遺伝子プロモーター配列を示す図である。

【図 23】

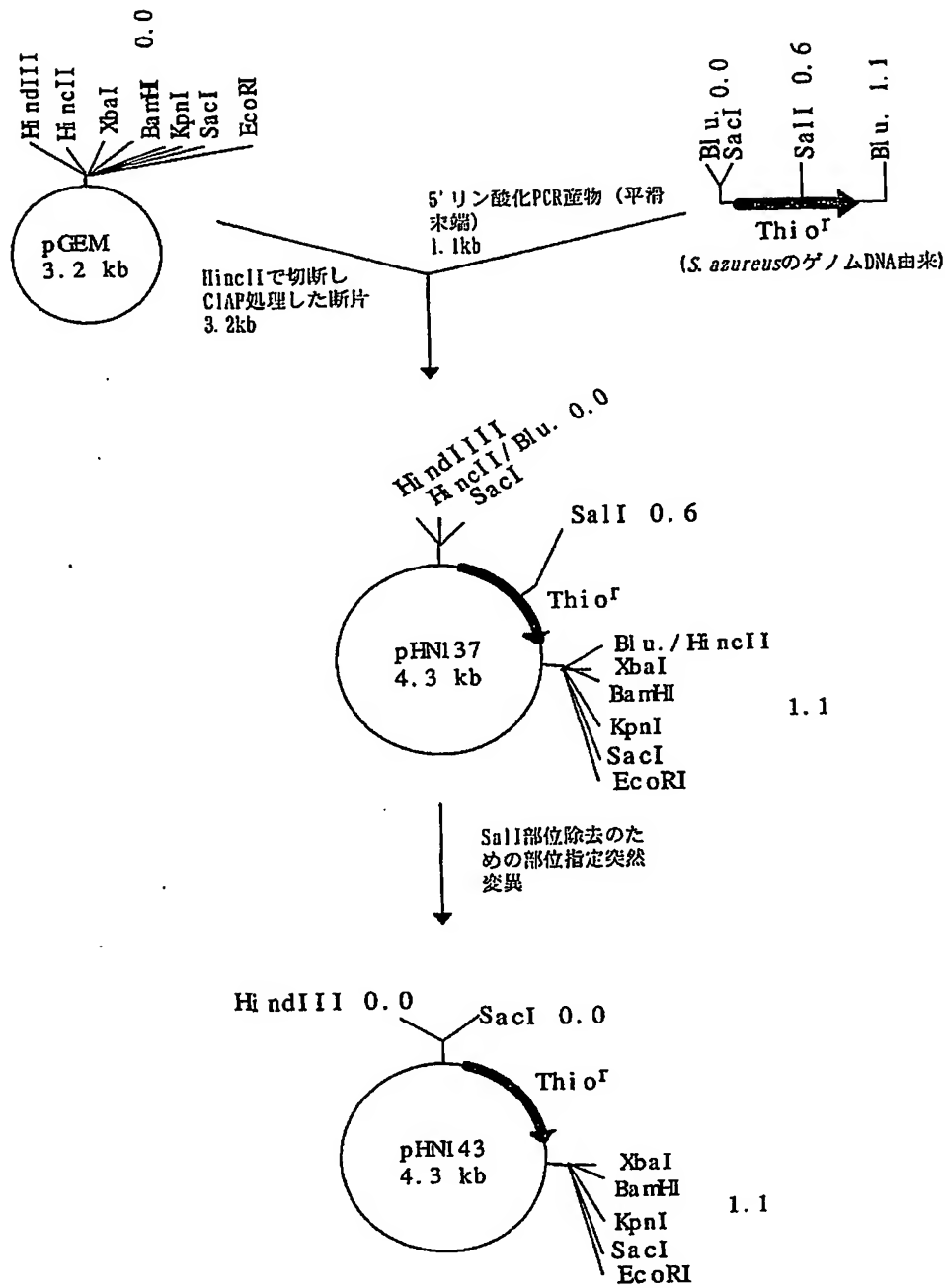
TipA遺伝子プロモーター中のRBS配列 (WT RBS) のLG10 RBSへの改良を示す図である。

【書類名】 図面

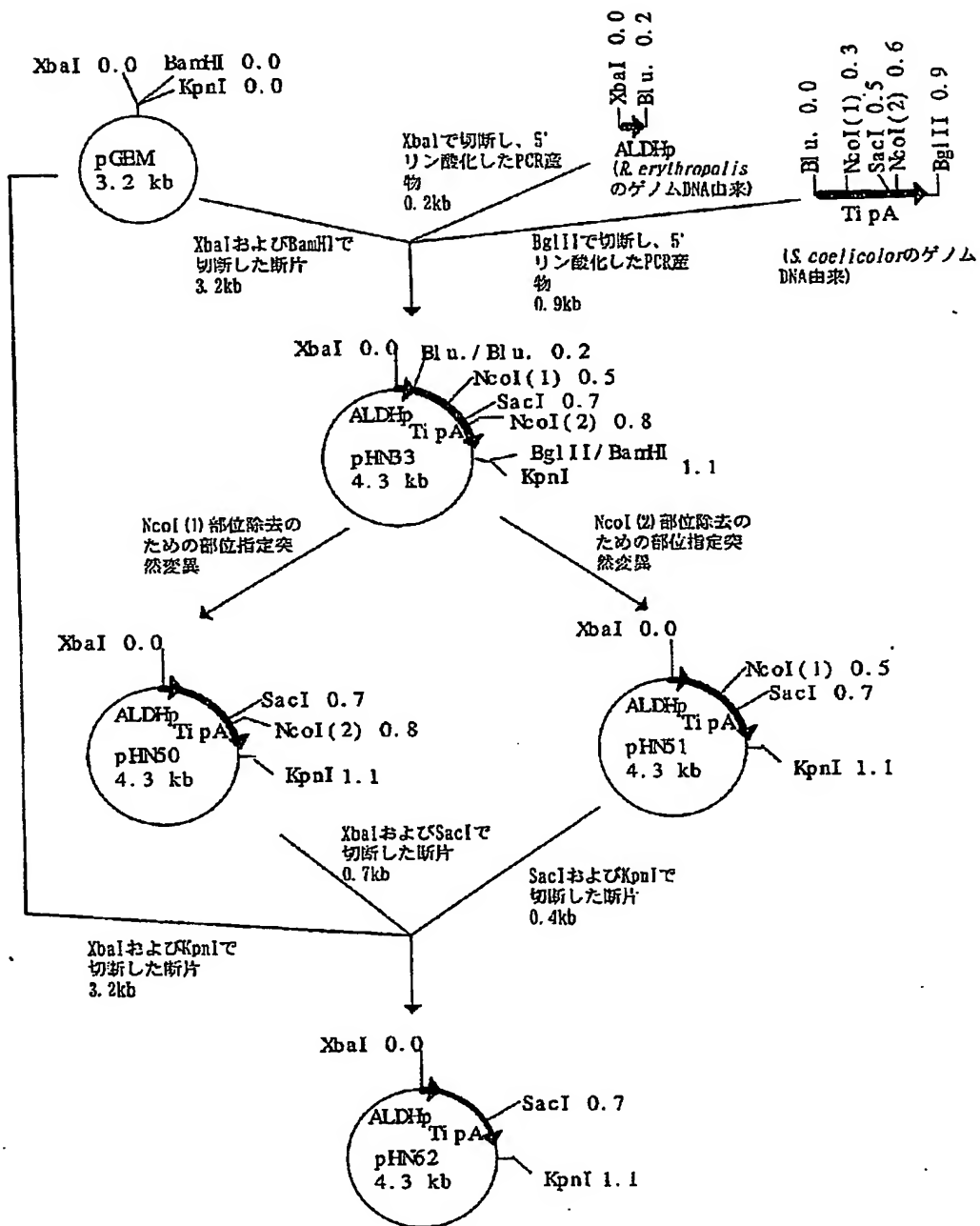
【図1】



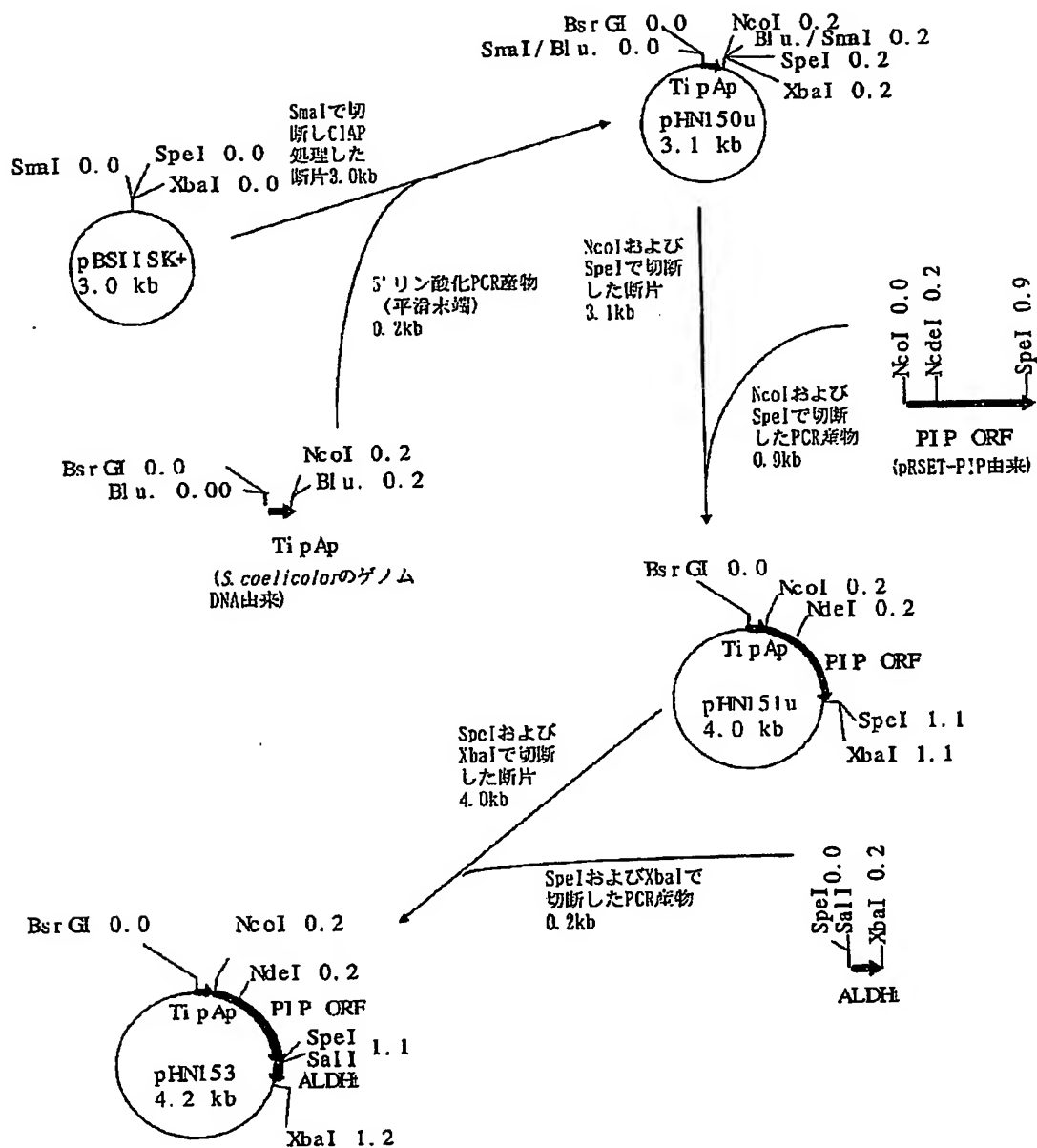
【図 2】



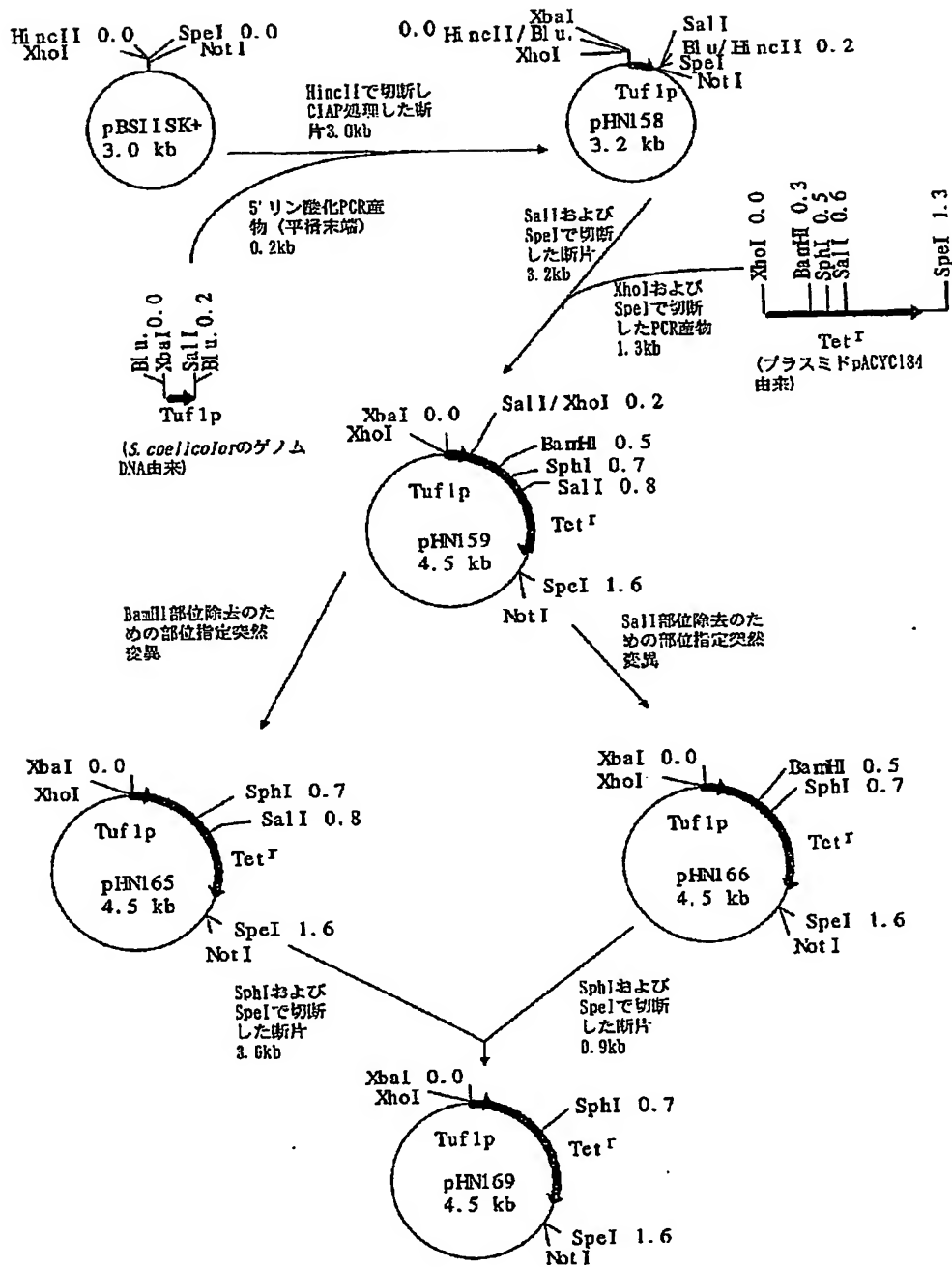
【図3】



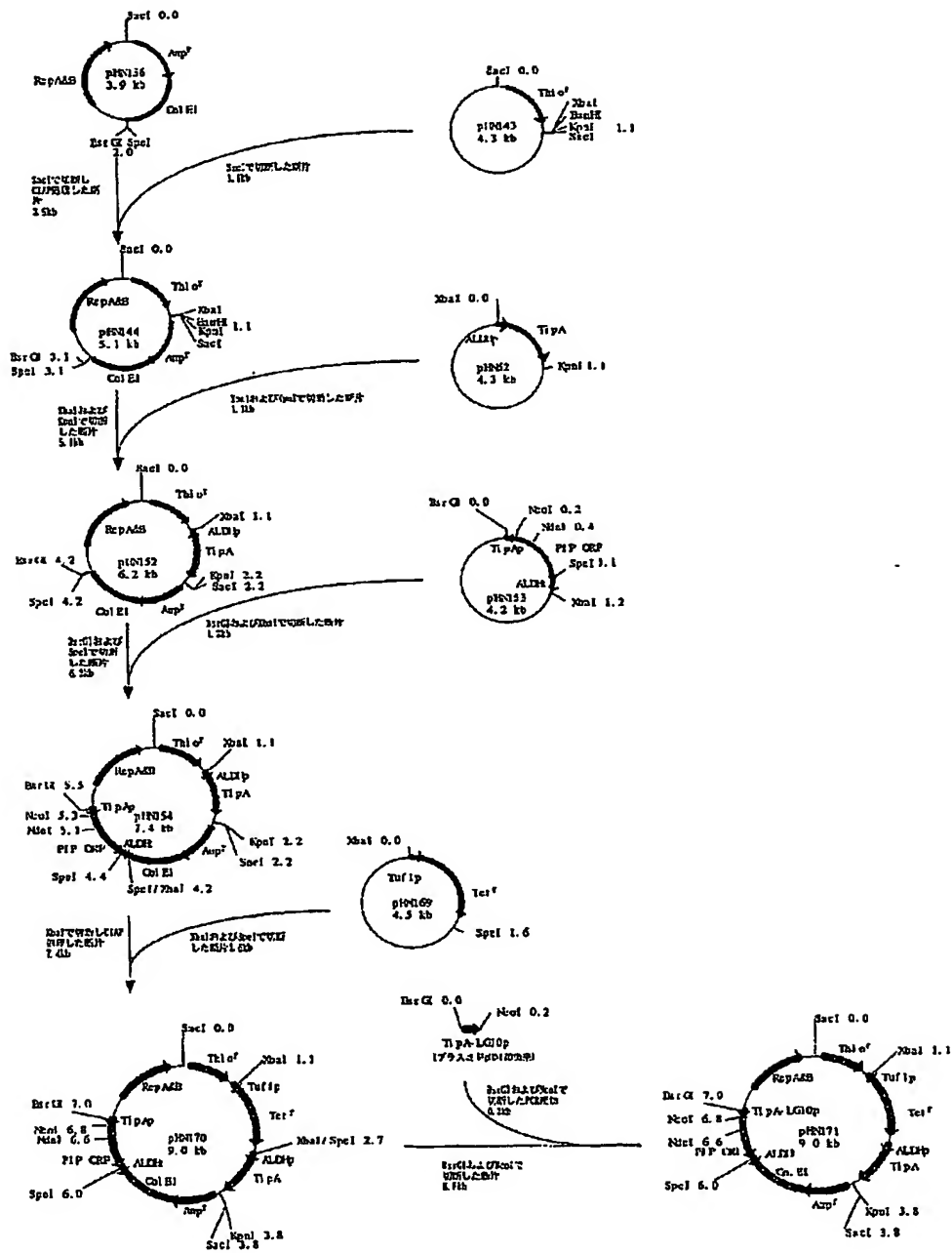
【図 4】



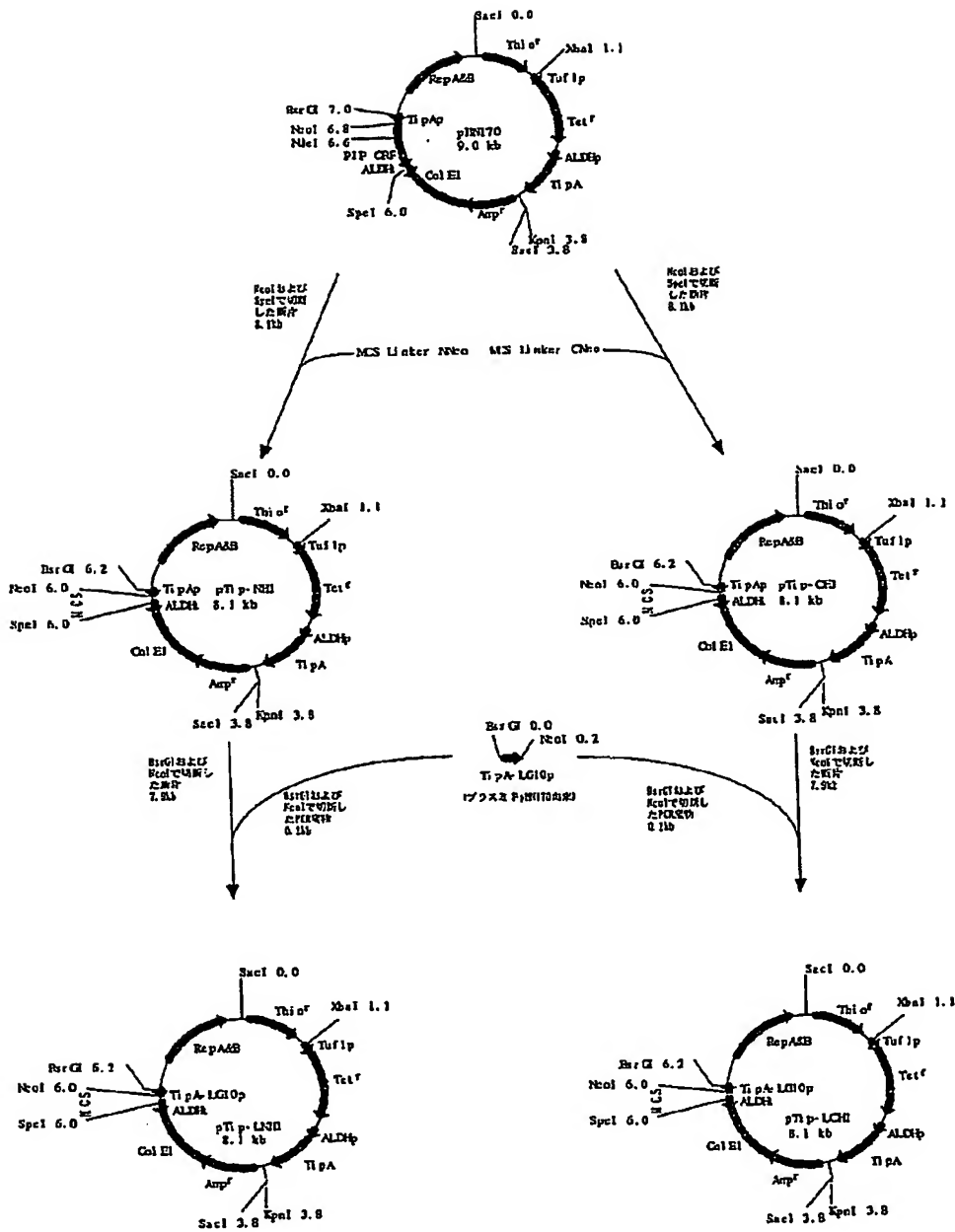
【図5】



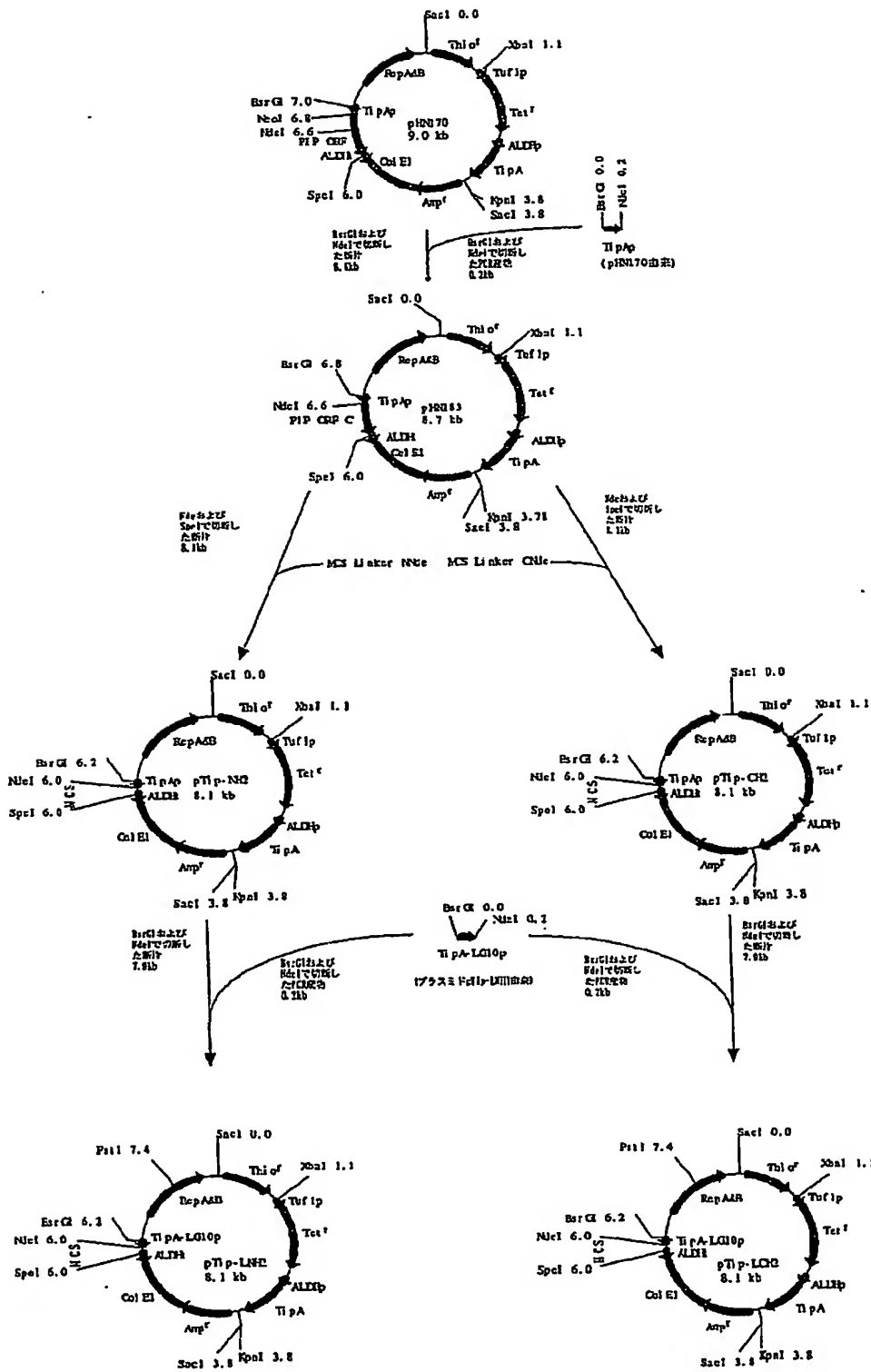
【図 6】



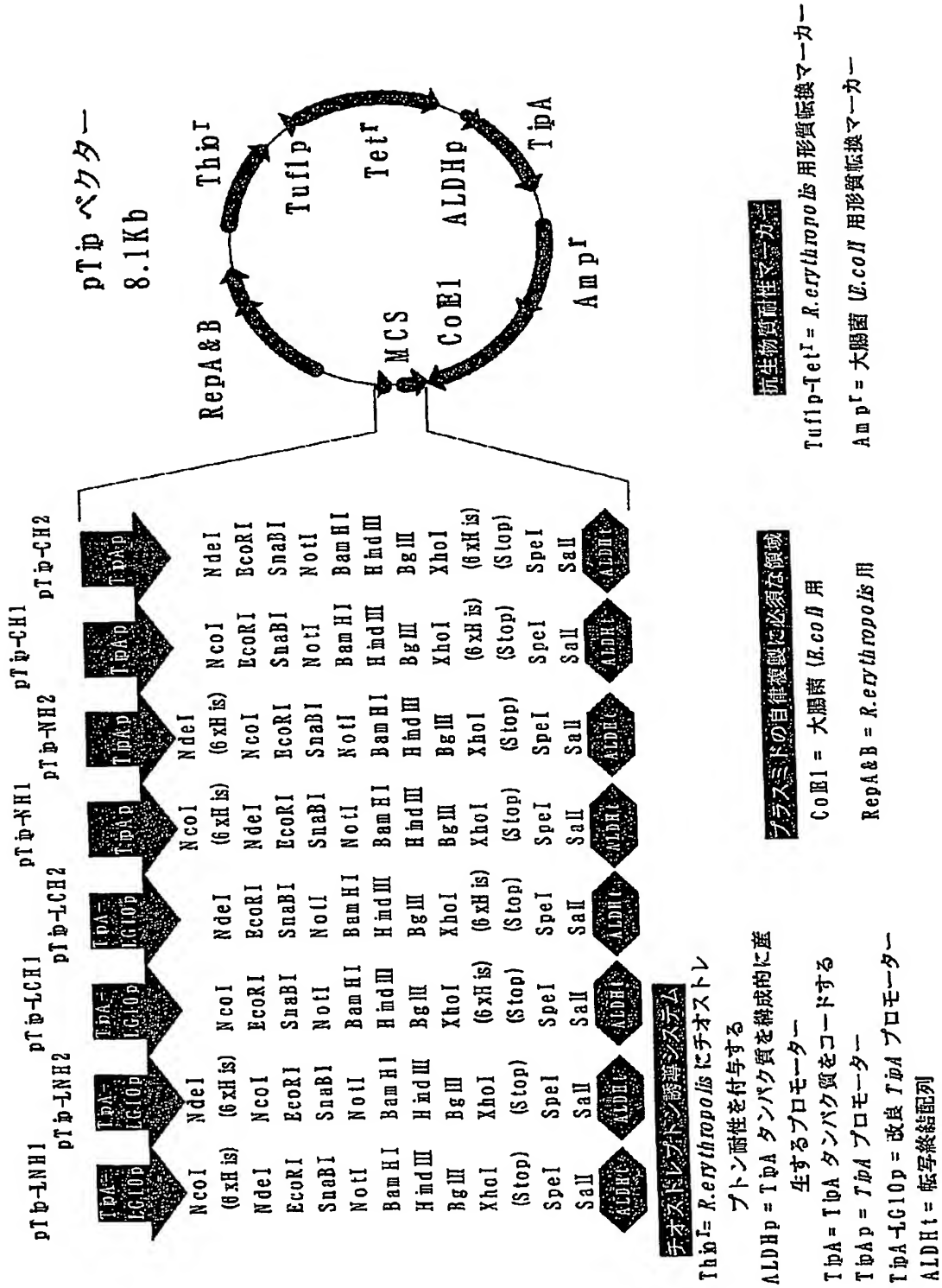
【図 7】



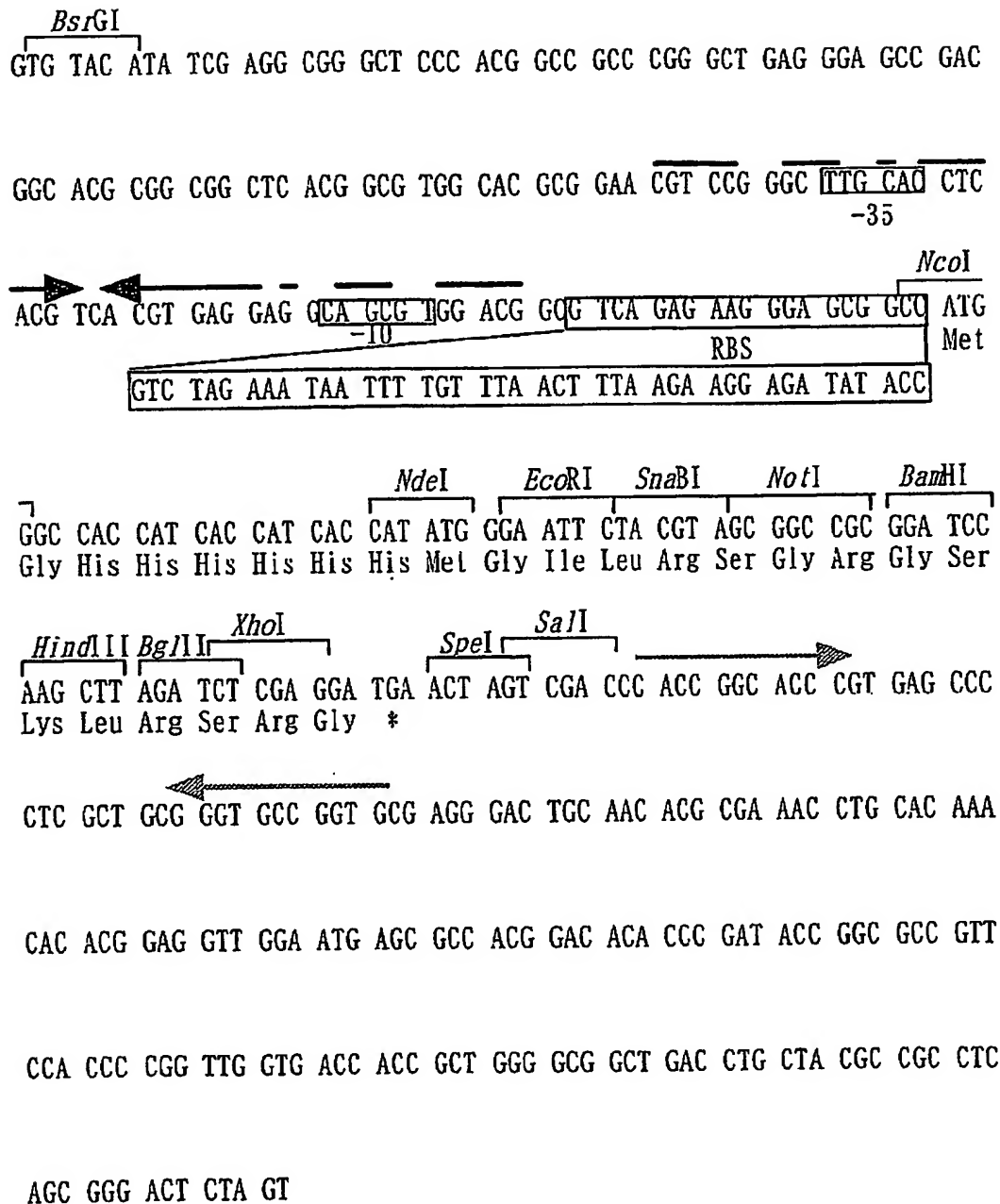
【図8】



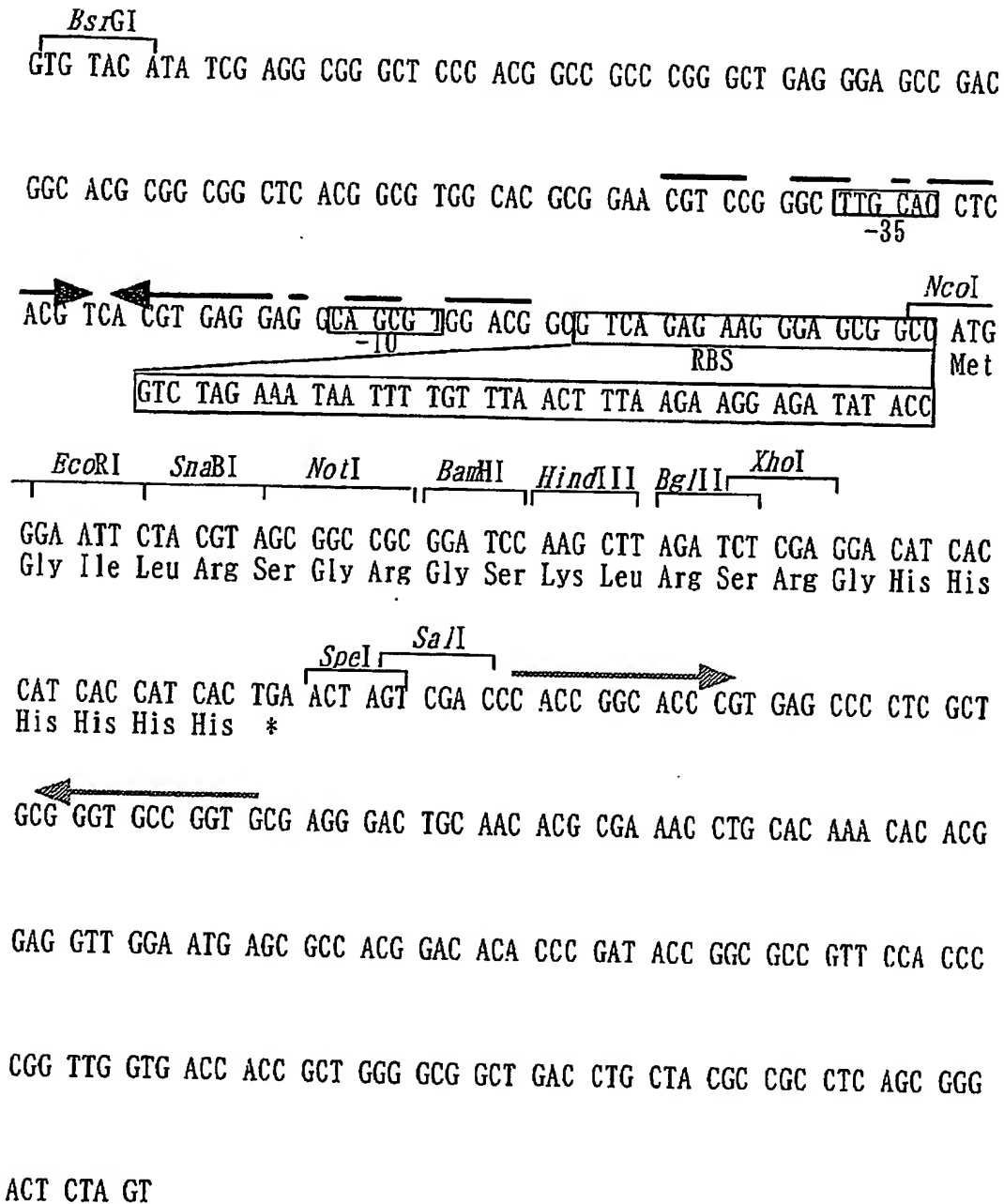
【図9a】



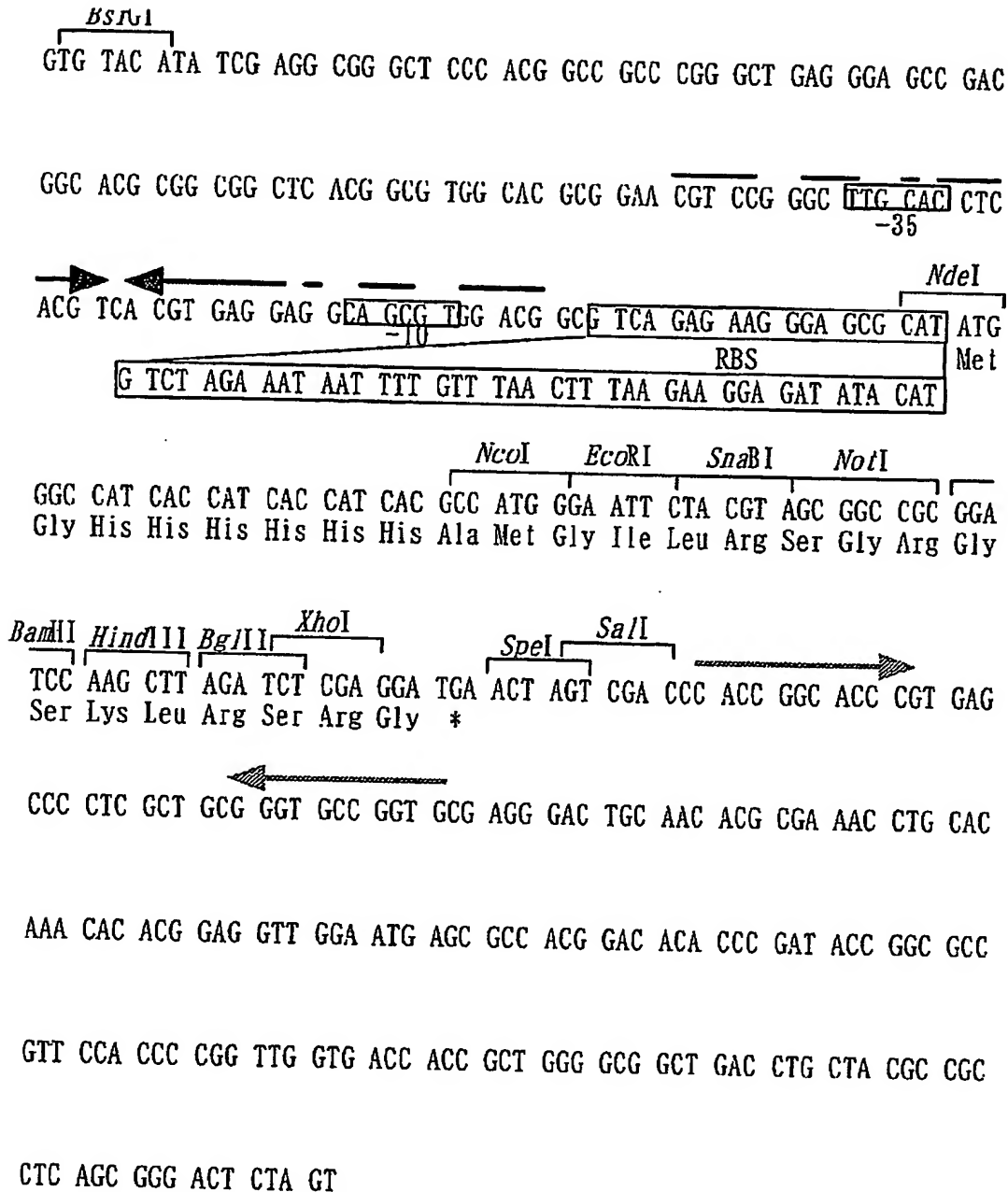
【図 9 b】



【図 9 c】

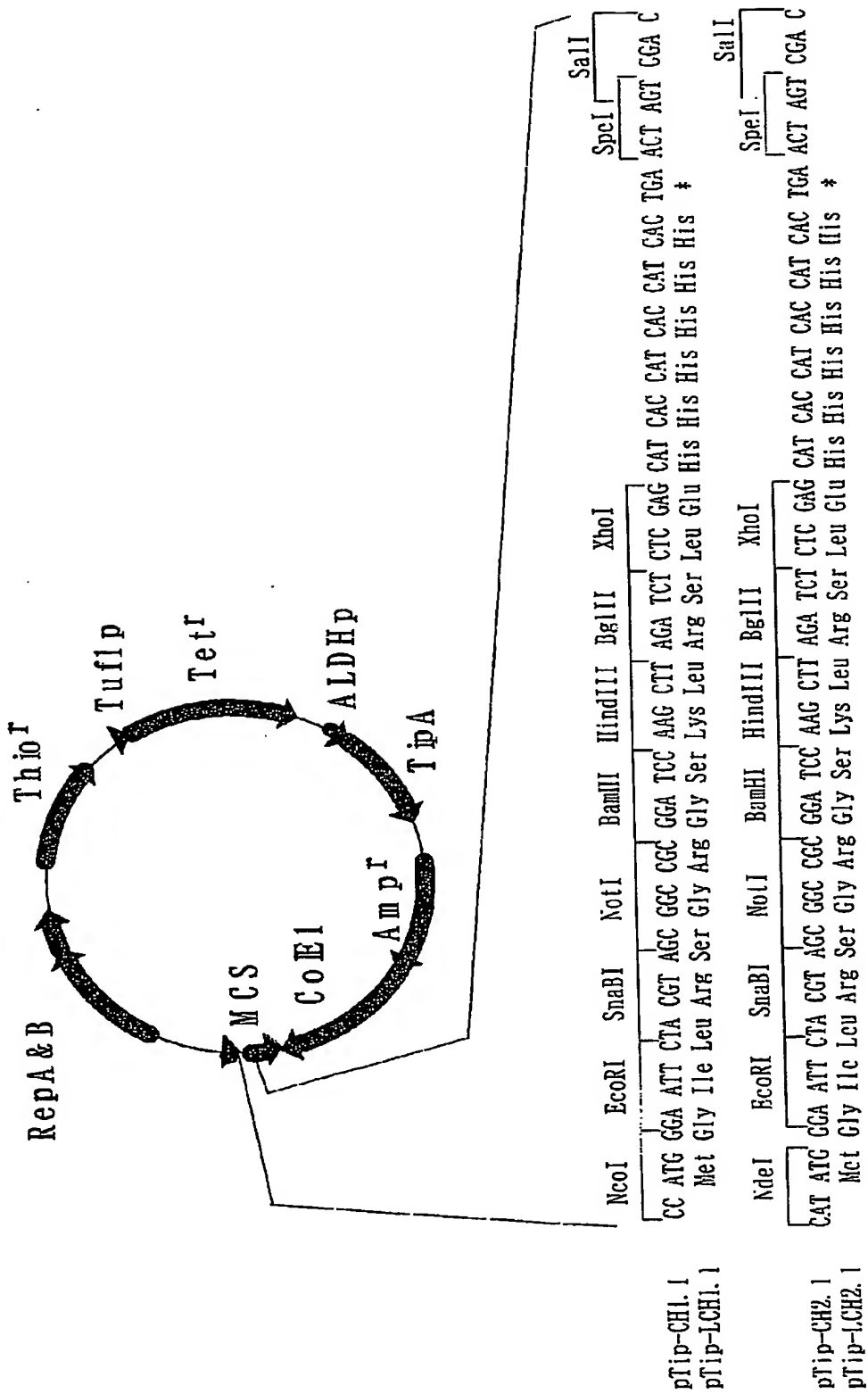


【図 9 d】

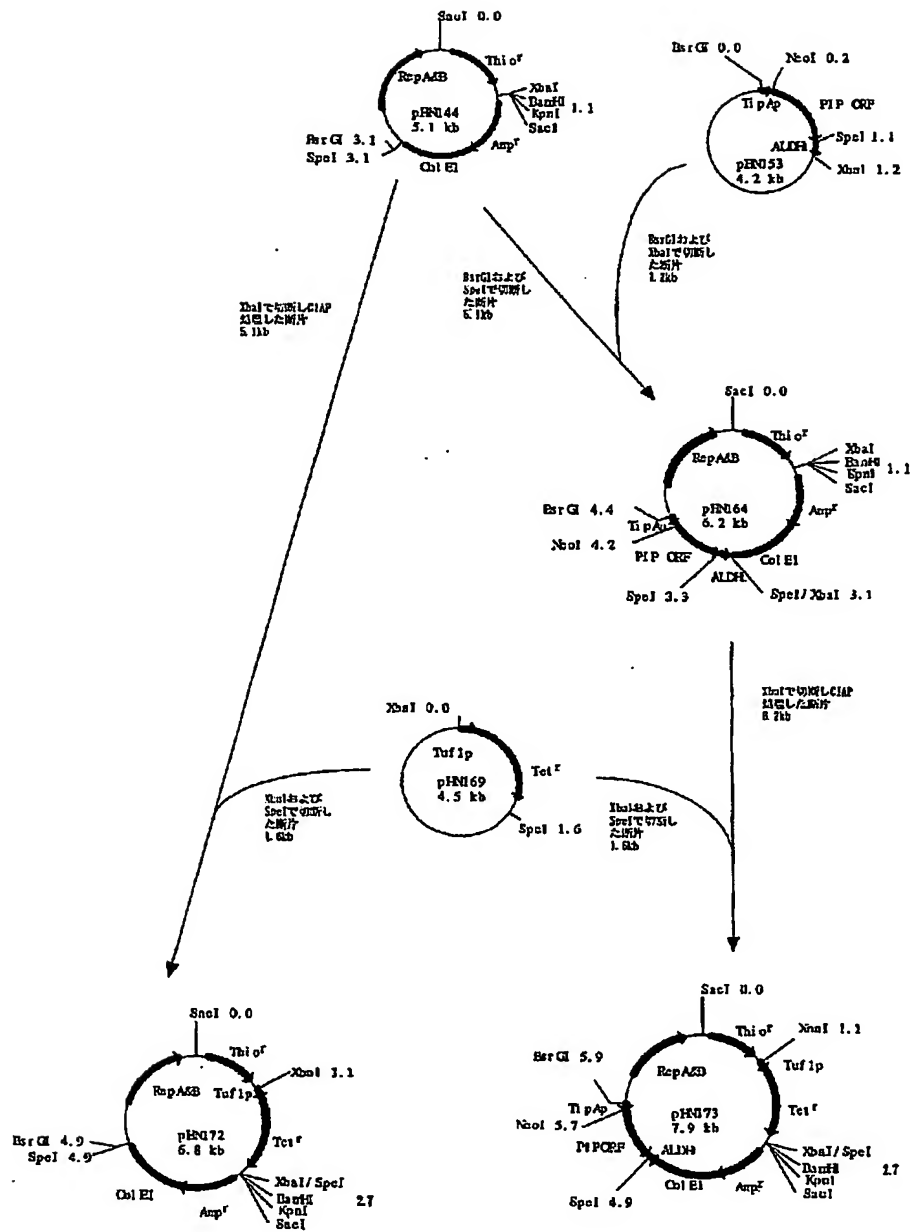


^{*BsrGI*}
 GTG TAC ATA TCG AGG CGG GCT CCC ACG GCC GCC CGG GCT GAG GGA GCC GAC
 GGC ACG CGG CGG CTC ACG GCG TGG CAC GCG GAA CGT CCG GGC TTG CAC CTC
 -35
 ACG TCA CGT GAG GAG GCA GCG TGG ACG GCG TCA GAG AAG GGA GCG CAT ATG
 -10 RBS Met
 G TCT AGA AAT AAT TTT GTT TAA CTT TAA GAA GGA GAT ATA CAT
^{*EcoRI*} ^{*SnaBI*} ^{*NotI*} ^{*BamHI*} ^{*HindIII*} ^{*BglII*} ^{*XhoI*}
 GGA ATT CTA CGT AGC GGC CGC GGA TCC AAG CTT AGA TCT CGA GGA CAT CAC
 Gly Ile Leu Arg Ser Gly Arg Gly Ser Lys Leu Arg Ser Arg Gly His His
 CAT CAC CAT CAC TGA ^{*SpeI*} ^{*SaII*} CGA CCC ACC GGC ACC CGT GAG CCC CTC GCT
 His His His His *
 CCG GGT GCC GGT GCG AGG GAC TGC AAC AUG CGA AAC CTG CAC AAA CAC ACC
 GAG GTT GGA ATG AGC GCC ACG GAC ACA CCC GAT ACC GGC GCC GTT CCA CCG
 CCG TTG GTG ACC ACC GCT GGG GCG GCT GAC CTG CTA CGC CGC CTC AGC GGC
 ACT CTA GT

【図 10】



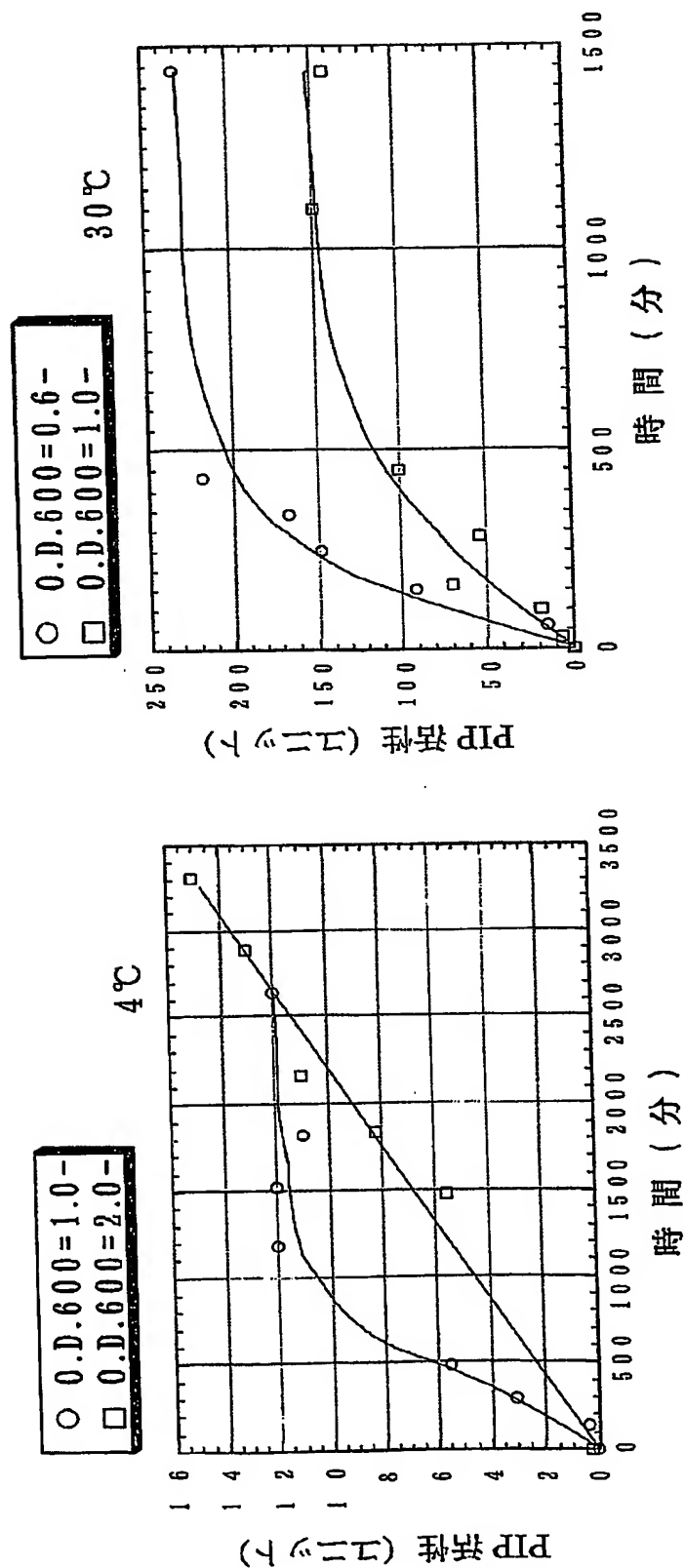
【図 11】



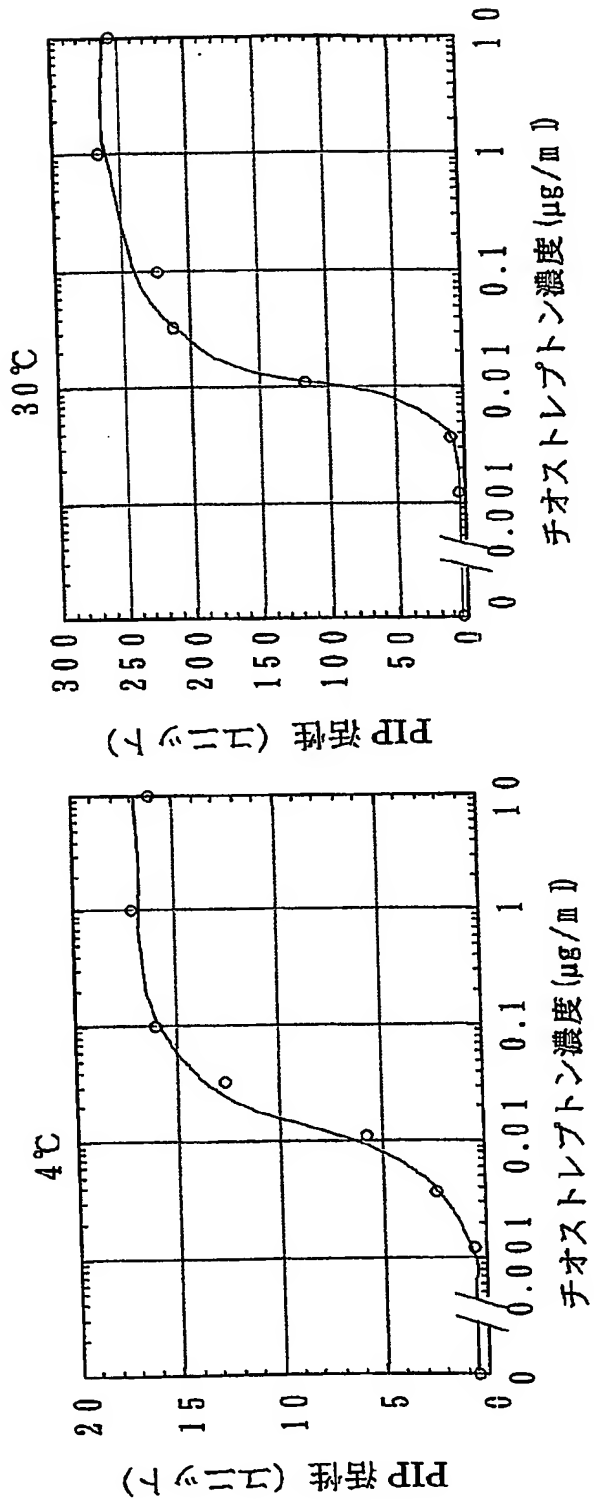
【図 12】

活性 (+/+チオストレプトン) (ユニット)		培養温度 (°C)	培養容積 (μl)	<i>R. erythropolis</i> の形質転換に用いた プラスミド	Inducer cassette		Expression cassette			
100 μg/ml チオストレプトン	+				ALDHp	TipA	TipAp	PIP	ORF	ALDHE
+	-	16/0.5	5	pHN170	+	-	+	+	+	+
		0.1/0.2	5	pHN173	-	-	-	-	-	-
		0.1/0.1	5	pHN172	-	-	-	-	-	-
		241/4	0.5	pHN170	+	+	+	+	+	+
		0.9/0.6	0.5	pHN173	-	-	-	-	-	-
		0.3/0.3	0.5	pHN172	-	-	-	-	-	-





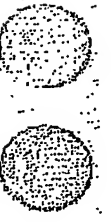

【図 13】



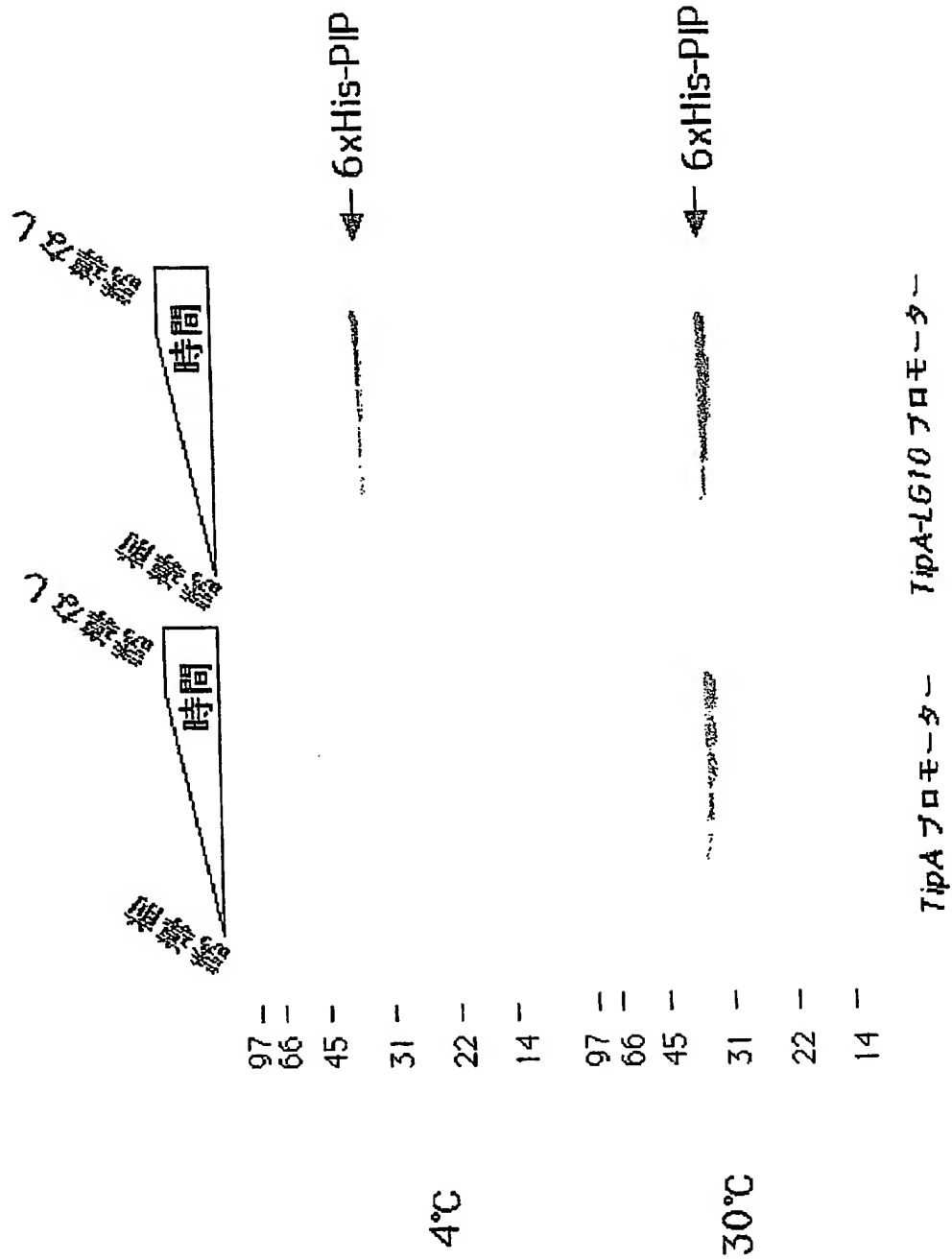
【図 14】



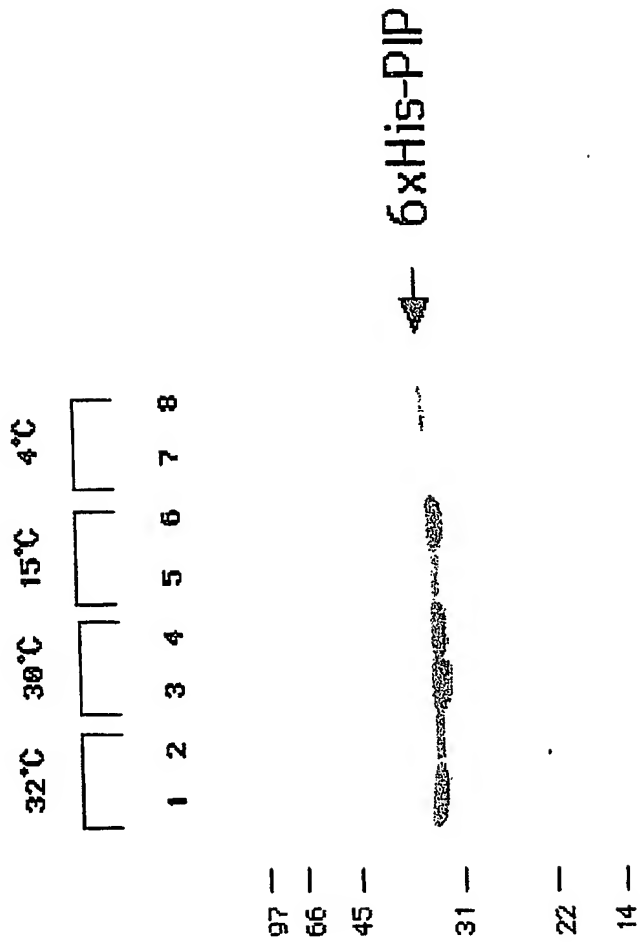
【図 15】

1µg/ml チオストレプトン	活性 (+/-チオストレプトン) (ユニット)	培養温度 (°C)	pHN170で形質転換された 宿主株	培養容積 (µl)
+	-			
	13/0.8	4°C	<i>R. erythropolis</i>	20
	7/0.8	4°C	<i>R. fascians</i>	20
	1.9/0.3	4°C	<i>R. opacus</i>	100
	215/2	30°C	<i>R. erythropolis</i>	2.5
	34/0.4	30°C	<i>R. fascians</i>	2.5
	6/1	30°C	<i>R. opacus</i>	20

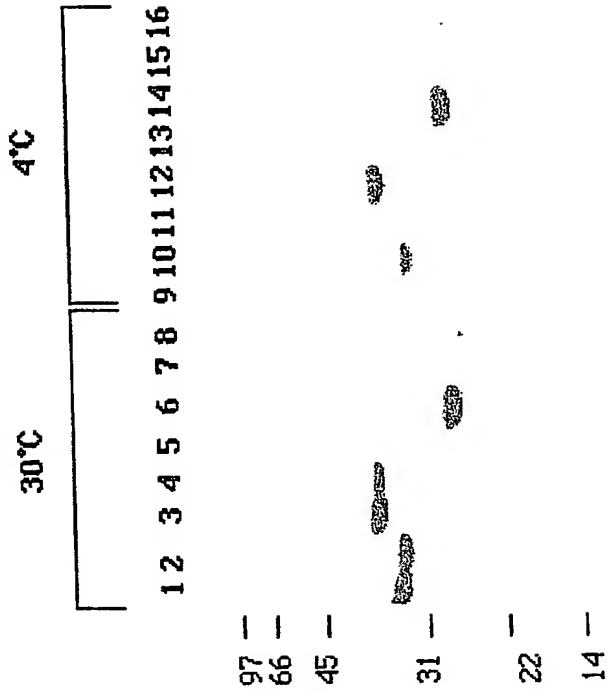
【図 16】



【図 17】



【図 1 8】



【図 19】

温度	レポーター	WT	LG10	倍率 (LG10/WT)
30°C	PIP	11	6.3	0.57
	AtPIP	11	4.6	0.39
	GFP	1.1	10	9.1
	GST	0.16	1.3	8.1
4°C	PIP	0.29	2.6	8.9
	AtPIP	0.13	2.9	22
	GFP	<0.01	3.9	>390
	GST	<0.01	1.3	>130

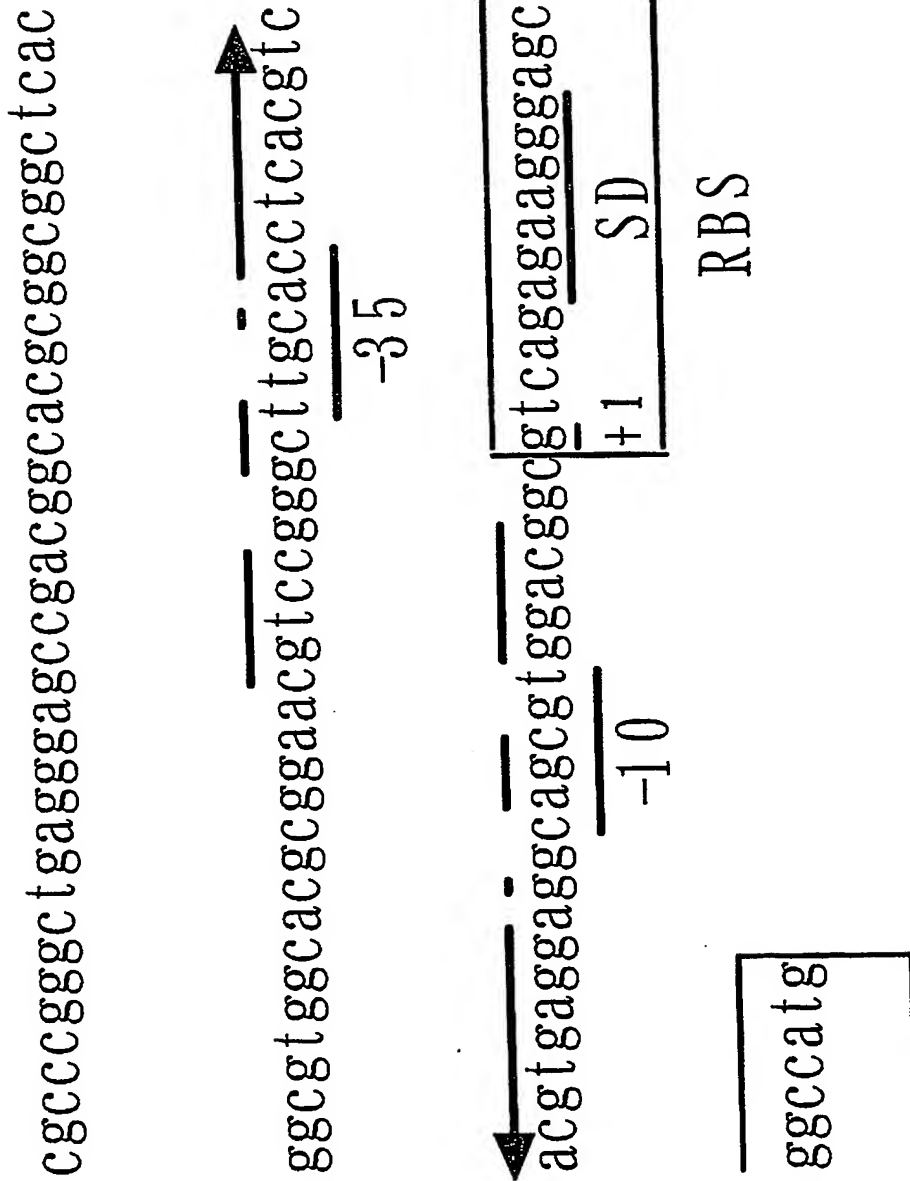
【図 20】

分類	GenBank 受入番号	種類	数
機能上既知タンパク質 (複数とれたもの)		6	16
Serum amyloid A (Saal)	M11131		6
NADH dehydrogenase 1 α 4	BC011114		2
Pantotate kinase 1 β	AF200357		2
Retinol binding protein 4 (RBP4)	AK008765		2
Major urinary protein 4 like	BC019965		2
Histidine-rich glycoprotein	NM 053176		2
機能上既知タンパク質 (複数とれなかったもの)		24	24
Cytochrome b5 like	AK002426		1
Fibrinogen A alpha	BC005467		1
Clusterin	NM 013492		1
Splicing factor 3b subunit 1 155kDa	NM 031179		1
Haptoglobin	NM 017370		1
Peroxiredoxin 4	BC019578		1
Inter-alpha-trypsin inhibitor Heavy Chain 2	NM 010582		1
RIKEN130000F09, Highly similar to VIP36	NM 025828		1
Serum albumin	AJ011413		1
Arylacetate deacetylase	BC019999		1
New cDNA, Highly similar to UDP-Glycosyltransferase	-		1
RIKEN1300017J02, Highly similar to Transferrin	AK005035		1
Phosphatidylinositol 3-kinase	NM 008839		1
Protein kinase C receptor (RACK1) like	D29802		1
EGF receptor	AF275367		1
Retinoic acid receptor responsive protein TIG2	AK002298		1
Insulin-like growth factor IA	X04480		1
Transferrin	BC022986		1
Apolipoprotein A-V	NM 080434		1
Fatty Acid Binding Protein 1 (FABP1)	BC009812		1
Retinoblastoma binding protein 7 (Rbbp7)	NM 009031		1
Zinc fingers and homeoboxes protein 1 (Zhx1)	NM 009572		1
Tumor differentially expressed 1 like (Tde1)	NM 019760		1
RIKEN1300006C19, Highly similar to OSTTT3	AK018758		1
機能上未知タンパク質		4	4
IMAGE:4239007, DUF92 like membrane Protein?	BC016895		1
New cDNA, No homology	-		1
IMAGE:3489640, Bone marrow stromal protein like?	BC008532		1
RIKEN1500015G18, No homology	NM 025439		1
小計		34	44
他のタンパク質 (ORF外または重要でないタンパク質)			382
総計			426

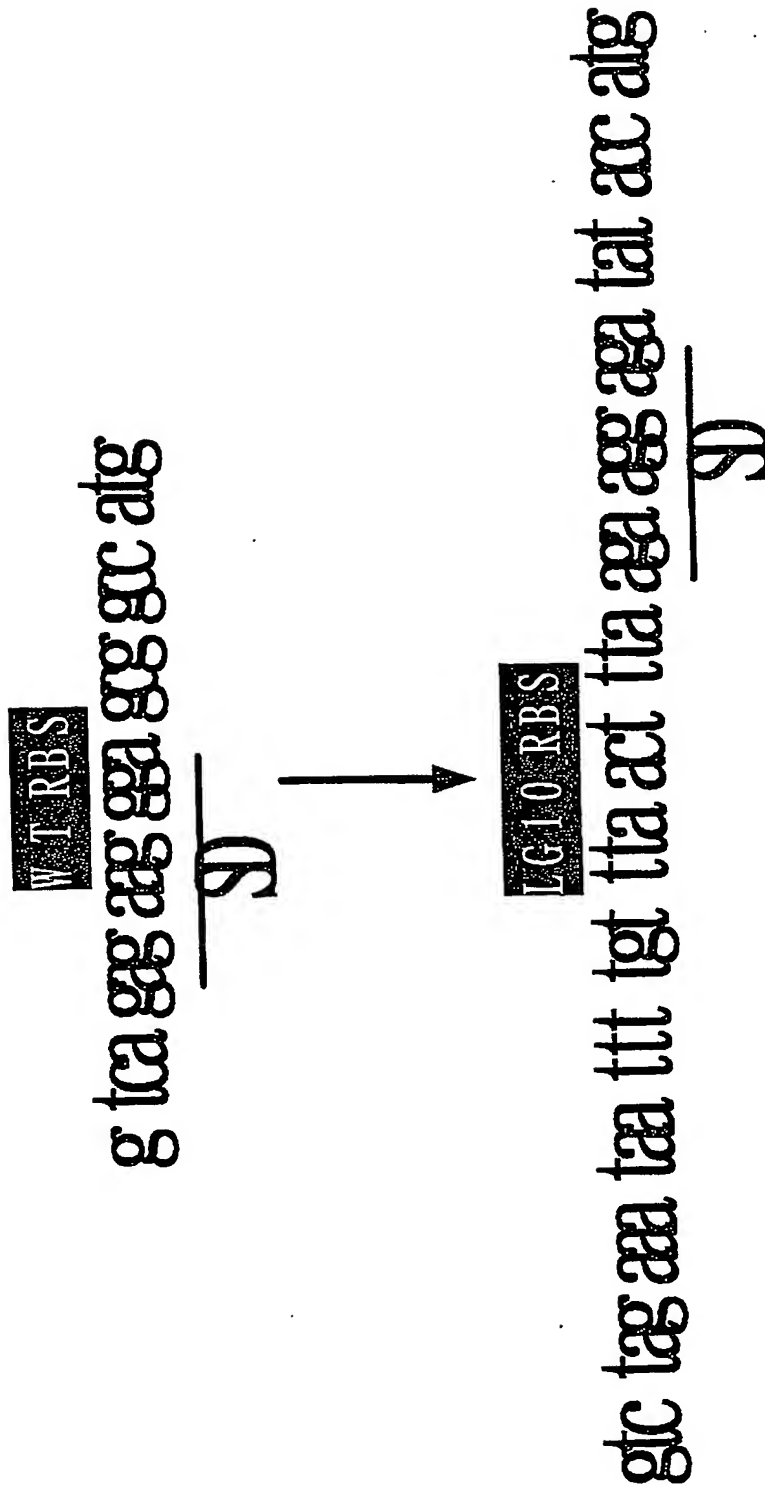
【図 2 1】

カテゴリー	タンパク質	6xHis タグ	推定 分子量	<i>R. erythropolis</i>			<i>E. coli</i>		
				プラスミド名	Sup/Pdt	増殖	プラスミド名	Sup/Pdt	増殖
スクリーニングにより分離したタンパク質	Saa1	N'	12 (14)	pHN205	0.4/1	-	pHN193	N.D./N.D.	+
	NADH4	N'	9	pHN206	N.D./0.2	+	pHN195	N.D./N.D.	++
	Cytochrome b5l	N'	15	pHN208	0.2/8	+	pHN199	N.D./0.8	+
	LE123	N'	19 (21)	pHN287	0.04/0.08	+	pHN276	N.D./N.D.	+
	Transferrin	N'	75 (77)	pHN289	0.2/0.8	+	pHN277	0.2/0.2	++
	Ana5	N'	39 (41)	pHN288	3/8	+	pHN281	N.D./N.D.	+++
	PanK	N'	42				pHN279	2/N.D.	++
	Peroxisomal protein 4	N'	27 (31)				pHN278	4/0.4	++
	TEL	N'	75 (77)				pHN280	0.2/0.2	++
		N'					pHN273	N.D./N.D.	+++
不溶性プロテアーゼ	Cathepsin D	C'	43 (45)	pHN270	2/3	++	pHN275	N.D./N.D.	+++
	Prothrombin	C'	30 (70)	pHN271	N.D./N.D.	+			
	Kallikrein6	C'	26 (29)	pHN272	0.3/0.3	+++			
細胞増殖阻害タンパク質	LSDase	N'	36 (33)	pHN299	N.D./N.D.	+			
	DLAD	N'	38 (41)	pHN284	N.D./N.D.	+			
	HMG-1	N'	25	pHN285	4/0.2	-	pHN305	0.2/0.1	-
	Kid1	N'	66	pHN286	N.D./0.08	-	pHN212	N.D./N.D.	-
低温依存的に可溶化されるタンパク質	Bax.alpha	N'	21	pHN217	N.D./N.D.	-			
	Glucokinase	N'	52	pHN298	4/2	++	pHN306	5/1	+++
	p37A	C'	38	pHN291	4/0.2	+++	pHN308	4/N.D.	+++
ポジティブコントロール	PIP	C'	33	pHN171	6/0.7	+++	pBAD/HIS/lacZ	4/0.5	+++
	LacZ	N'	120						

【図 22】



【図 23】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 低温でタンパク質を発現することができる誘導型発現ベクターおよび該ベクターを用いて低温でタンパク質を発現させる方法の提供。

【解決手段】 約15℃を超える中高温条件下では発現産物が宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質をコードする遺伝子を、低温条件下で増殖可能な宿主細胞中で誘導発現し得る誘導型発現ベクター。

【選択図】 なし

特願 2002-235008

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[301021533]

1. 変更年月日

2001年 4月 2日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区霞が関1-3-1

氏 名

独立行政法人産業技術総合研究所

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.